

**Untersuchungen zur Ontogenese von Langerhans Zellen
und zu ihrer Immigration in die humane Epidermis**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kristine Kohl

aus Marburg

Bonn, 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. T. Bieber

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. N. Koch

Tag der Promotionsprüfung: 29.08.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum Februar 2004 bis März 2007 von Herrn Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. T. Bieber und Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Koch betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht (gemäß §6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004).

Bonn, den 03.04.2007

Kristine Kohl

*Der Langsamste, der sein Ziel nicht aus den Augen verliert,
geht immer noch geschwinder als der, der ziellos umherirrt.*

Gotthold Ephraim Lessing

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herkunft von Langerhans Zellen und ihre Immigration in die Epidermis untersucht. Aus CD34-positiven Stammzellen generierte DC (CD34DC) und Monozyten als Vorläufer von Langerhans Zellen wurden vor und nach *in vitro* Migrations-Experimenten phänotypisch untersucht. CD34DC konnten aufgrund der Expression des monozytären Markers CD14 und des DC-Markers CD1a in vier Populationen, Monozyten aufgrund der Stärke der CD14 Expression in zwei Subpopulationen unterteilt werden. CD34DC und aus Monozyten generierte DC (MoDC) adhärten spezifisch an Laminin 332, dem Hauptbestandteil der Basalmembran zwischen Dermis und Epidermis, und Fibronectin, dem Hautbestandteil der Dermis. CD1a-positive CD34DC banden stärker an Fibronectin als CD14 exprimierende CD34DC. Im Gegensatz dazu banden die CD14 exprimierenden CD34DC bevorzugt an Laminin 332. Diese Befunde erklären eine differentielle Lokalisierung der einzelnen Subpopulationen in der Haut.

Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sezernieren Chemokine, auf die Vorläufer von Langerhans Zellen chemotaktisch reagieren. Die konditionierten Medien von Fibroblasten (FCM) und Keratinozyten (KCM) wurden in einem *in vitro* Migrations-Modell eingesetzt, um die transendotheliale Migration von CD34DC und Monozyten zu untersuchen. CD14_{low} Monozyten, die transendothelial in FCM hinein migriert waren, exprimierten nach Migration und Kultivierung in diesem Medium CD1a und CCR6, waren also zu *bona fide* DC differenziert. Sie sind als die direkte Vorläuferzellpopulation von DC bzw. Langerhans Zellen im Blut anzusehen. Im Gegensatz zu spontan migrierten Monozyten oder nicht migrierten Monozyten konnten Monozyten, die zunächst transendothelial in FCM hinein migriert waren, in einer zweiten Migration spezifisch auf KCM hin migrieren. Dafür verantwortlich war die Stabilisierung des Chemokinrezeptors CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Monozyten. CD14_{high} Monozyten, die in FCM migriert waren, exprimierten weiterhin CCR2 im Gegensatz zu spontan migrierten CD14_{high} Monozyten und nicht migrierten Monozyten. Die Stabilisierung von CCR2 an der Zelloberfläche erfolgte durch die Bindung von MCP-1/CCL2, was durch die Inhibition der Stabilisierung durch einen MCP-1 neutralisierenden Antikörper belegt wurde. Die Determination der CD14_{high} Monozyten nach transendothelialer Migration in das dermale Milieu scheint noch offen zu sein, da diese Zellen durch die andauernde Expression von CCR2 weiter auf Keratinozyten-spezifische Faktoren reagieren können, allerdings noch nicht zu DC differenziert sind.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
7AAD	7-Aminoactinomycin D
AB/AM	Antibiotika/Antimykotika
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zelloberflächenmarker (engl.: cluster of differentiation)
CD14 _{high}	Monozyten, die CD14 stark exprimierten
CD14 _{low}	Monozyten, die CD14 wenig exprimierten
CD14 _{pos}	CD14 einfach positive CD34DC
CD1a _{pos}	CD1a einfach positive CD34DC
CD34DC	Aus CD34 positiven Stammzellen generierte DC
cm ²	Quadratcentimeter
DED	Deepidermisierte Dermis
D	Dalton
d	Tage
DC	dendritische Zellen
dDC	dermale DC
DF	Durchflusszytometrie
DMEM	Dulbecco`s MEM
dMΦ	Dermale Makrophagen
DN	CD14/CD1a negative CD34DC
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP	CD14/CD1a-positive CD34DC
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EnCM	Endothelzellen-konditioniertes Medium
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

FCM	Fibroblasten konditioniertes Medium
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Lichtstreuung in gerader Richtung (engl.: forward scatter)
GM-CSF	Granulocyte macrophage stimulating factor
h	Stunde
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HE	Hämatoxylin/Eosion
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kbp	Kilo Basenpaare
KCM	Keratinocyten-konditioniertes Medium
LPS	Lipopolysaccherid
MCP	Monocyte/macrophage chemoattracting protein
MEM	Modified Eagle`s Minimum Essential Medium
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Matrigel
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min.	Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
MoDC	Aus Monozyten generierte DC
mRNA	Messenger RNA
n=	Anzahl n der durchgeführte Versuche
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1(CD31)
RFI	Relativer Fluoreszenzindex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium

RT-PCR	Reverse transkriptase polymerase chain reaction
SSC	seitliche Lichtstreuung (engl.:sideward scatter)
β-Me	β-Mercaptoethanol
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TM	Temperatur
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
T-Zelle	T-Lymphozyt
U	Unit(s) (Maß für biologische Aktivität)
u. a.	Unter anderem
upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
ABKÜRZUNGEN	IV
INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE MENSCHLICHE HAUT	1
1.2 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM).....	2
1.3 INTEGRINE	4
1.4 IMMUNKOMPETENTE ZELLEN IN DER HAUT	5
1.4.1 Funktion der dendritischen Zellen.....	6
1.4.2 Funktion der Langerhans Zellen	8
1.4.3 Ontogenese der Langerhans Zellen und der dermalen dendritischen Zellen.....	8
1.4.4 Migration von Langerhans Vorläuferzellen	12
1.5 DIE ROLLE VON CHEMOKINEN BEI DER IMMIGRATION VON VORLÄUFERZELLEN DER DERMALEN DC UND LANGERHANS ZELLEN.....	16
1.6 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 PUFFER UND LÖSUNGEN	19
2.2 HERKUNFT HÄUFIG VERWENDETER REAGENZIEEN UND GERÄTE.....	21
2.3 ZELLKULTUR	24
2.3.1 Humane dermale microvasculäre Endothelzellen (HDMEC).....	24
2.3.2 Fibroblasten	24
2.3.3 Humane primäre Keratinozyten	25
2.3.4 CD34DC.....	27
2.3.5 Monozyten	29
2.3.6 Konstruktion des in vitro Hautmodells.....	31
2.4 FUNKTIONELLE ANALYSEN	32
2.5 IMMUNOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN	34
2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
3 ERGEBNISSE	42
3.1 PHÄNOTYP DER LANGERHANS VORLÄUFERZELLEN IM BLUT	42
3.1.1 Monozyten als DC Vorläuferzellen	42
3.1.2 Aus Monozyten generierte DC (MoDC).....	45

3.1.3	Aus Stammzellen ($CD34_{pos}$ Zellen) generierte DC.....	50
3.1.4	Expression von Langerin.....	55
3.1.5	Differenzierung der einzelnen CD34DC Subpopulationen	57
3.2	ADHÄSION AN DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX UND KONTAKT DER LANGERHANS VORLÄUFERZELLEN MIT ENDOTHELZELLEN.....	59
3.2.1	Adhäsion von CD34DC und MoDC an Proteine der ECM.....	60
3.2.2	Rolle des Endothels.....	62
3.2.3	Chemokine in den konditionierten Medien.....	66
3.3	MIGRATION UND DIFFERENZIERUNG DER VORLÄUFERZELLEN IN DER DERMIS	68
3.3.1	Migration von CD34DC auf dermale Faktoren hin.....	69
3.3.2	Sequenzielle Migration von Monozyten auf Faktoren dermalen Zellkompartimente hin	72
3.3.3	Differenzierung der migrierten Monozyten im dermalen Kompartiment	78
3.3.4	Rolle des Chemokinrezeptors CCR2 auf den Monozyten.....	83
3.3.5	Identifizierung von Differenzierungsfaktoren für die Vorläuferzellen in den konditionierten Medien	85
3.4	EINWANDERUNG VON LANGERHANS VORLÄUFERZELLEN IN DIE EPIDERMIS.....	86
3.4.1	Migration von CD34DC in das epidermale Milieu.....	86
3.4.2	Migration monozytärer Vorläuferzellen in das epidermale Milieu.....	91
3.5	UNTERSUCHUNG ALLER HAUTKOMPARTIMENTE IN EINEM <i>IN VITRO</i> HAUTMODELL.....	94
3.5.1	Entwicklung des 3-Kompartimenten-Modells	95
3.5.2	Funktionelle Untersuchungen mit dem 3-K-Hautmodell.....	98
4	DISKUSSION	101
4.1	METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER IMMIGRATION VON LANGERHANS VORLÄUFERZELLEN	103
4.2	URSPRUNG DER LANGERHANS ZELLEN.....	105
4.2.1	Monozyten als Langerhans Vorläuferzellen.....	106
4.2.2	CD34DC als Langerhans Vorläuferzellen	109
4.3	ROLLE DER EINZELNEN KOMPARTIMENTE DER HAUT BEI DER IMMIGRATION VON VORLÄUFERZELLEN.	112
4.3.1	Funktion der Chemokine bei der Immigration der Vorläuferzellen	112
4.3.2	Für die Differenzierung der Vorläuferzellen verantwortliche Fibroblasten-spezifische Zytokine....	114
4.3.3	Rolle des Endothels bei der Immigration der Vorläuferzellen.....	116
4.4	EIN <i>IN VITRO</i> HAUTMODELL	118
5	LITERATUR	120
6	ANHANG	I
6.1	LEBENS LAUF.....	X
6.2	PUBLIKATIONEN	XI
6.2.1	Posterbeiträge und Vorträge.....	XI
6.3	DANKE!	XII

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Schematischer Aufbau der menschlichen Haut	1
Abb.1.2 Schema der Zelladhäsion und Zellbewegung auf der ECM (nach (Gumbiner, 1996))	5
Abb.1.3 Schema der Auswanderung von Leukozyten in die Haut (Schoen et al., 2003)	12
Abb.1.4. Schema der Einwanderung von Leukozyten in die Epidermis (Schoen et al., 2003)	15
Abb.2.1. Aufbau des Transwell-Migrations Tests	33
Abb.3.1.1 Expression von CD14 auf Monozyten	42
Abb.3.1.2 Expression von CD16 auf Monozyten	43
Abb. 3.1.3 Expression der Chemokinrezeptoren auf Monozyten	44
Abb.3.1.4 Expression von CD11b auf Monozyten	45
Abb.3.1.5 Differenzierung der Monozyten zu DC	46
Abb.3.1.6 Expression der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche von Monozyten und MoDC	47
Abb.3.1.7 Expression von Chemokinrezeptoren in Monozyten, MoDC und CD34DC (d7)	47
Abb. 3.1.8 Expression der β -Integrine CD18 und CD29 auf Monozyten und MoDC	48
Abb. 3.1.9 Expression der α -Integrine CD11a, CD11b und CD11c auf Monozyten und MoDC	49
Abb.3.1.10 Expression von α -Integrinen CD49b-f in Monozyten, MoDC d3 und d7 und CD34DC	50
Abb.3.1.11 Differenzierung von CD34 _{pos} Zellen zu CD34DC	51
Abb.3.1.12 Expression der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von CD34DC	52
Abb. 3.1.13 Expression von Integrinen auf CD34DC an d4 und d7	54
Abb.3.1.14 Expression von Langerin auf MoDC an d7	55
Abb.3.1.15 Expression von Langerin auf CD34DC unter Zugabe von TGF- β 1	56
Abb.3.1.16 Ontogenese der CD34DC Subpopulationen (Sortier-Experiment)	58
Abb.3.1.17 Einfluss von TGF- β 1 auf die Expression von Langerin in sortierten CD34DC	59
Abb.3.2.1 Adhäsion von CD34DC und MoDC an Proteine der ECM	60
Abb.3.2.2 Optische Dichte der an Proteine der ECM adhären DC	61
Abb.3.2.3 CD34DC Subpopulationen binden unterschiedlich an Laminin 332 und Fibronectin	62
Abb 3.2.4. Migration von CD34DC durch unbeschichtete und beschichtete Transwell-Membran auf KCM hin	64
Abb.3.2.5 Migration von Monozyten durch unbeschichtete und beschichtete Transwell-Membran in FCM hinein	65
Abb.3.2.6 Migration von Monozyten durch beschichtete und unbeschichtete Transwell-Membran in FCM (Prozent migrierte Zellen)	65
Abb.3.2.7 Chemokine in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten	67
Abb.3.2.8 Chemokine in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten	67
Abb.3.3.1 Migration von CD34DC auf Fibroblasten-konditioniertes Medium (FCM) hin	69
Abb.3.3.2 Migration von CD34DC auf MCP-1 hin; Inhibition durch einen anti-MCP-1	70

Antikörper	
Abb.3.3.3 Inhibition der spezifischen Migration von CD34 ⁺ DC auf FCM hin durch einen anti-MCP-1 Antikörper	71
Abb.3.3.4 Schema des experimentellen Aufbaus der sequenziellen Migration der Monozyten	73
Abb.3.3.5 Sequenzielle Migration von Monozyten	74
Abb.3.3.6 CCR1-Expression auf CD14 _{low} und CD14 _{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration	75
Abb.3.3.7 CCR2-Expression auf CD14 _{low} und CD14 _{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration	76
Abb.3.3.8 CCR2-Expression auf CD14 _{high} Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen in FCM	77
Abb.3.3.9 Induktion der CD1a-Expression auf Monozyten nach transendothelialer Migration in FCM	79
Abb.3.3.10 CD1a-Expression auf CD14 Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen in FCM	80
Abb.3.3.11 CCR6-Expression auf CD14 _{low} und CD14 _{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration	81
Abb.3.3.12 CCR6-Expression auf CD14 _{low} Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen in FCM	82
Abb.3.3.13 Migration von Monozyten auf MCP-1 hin; Inhibition durch einen anti-MCP-1 oder einen anti-CCR2 Antikörper	83
Abb.3.3.14 CCR2-Expression auf CD14 _{high} Monozyten nach Migration auf MCP-1 hin	84
Abb.3.3.15 TGF- β 1 Konzentration in den konditionierten Medien	85
Abb.3.4.1 Inhibition der Migration von CD34 ⁺ DC auf MIP-3 α hin durch einen anti-MIP-3 α Antikörper	88
Abb.3.4.2 Migration von CD34 ⁺ DC auf MCP-4 und MCP-4 + anti-MCP-1 Antikörper hin	89
Abb.3.4.3 Inhibition der spezifischen Migration von CD34 ⁺ DC auf KCM hin durch einen anti-MCP-1 Antikörper	89
Abb.3.4.4 Inhibition der spezifischen Migration von CD34 ⁺ DC in KCM hinein durch einen anti-CCR3 Antikörper	90
Abb.3.4.5 Konzentrationsabhängige Migration von Monozyten auf MCP-4 hin	93
Abb.3.4.6 Expression von CCR6 auf CD14 _{low} Zellen nach Migration auf MCP-4 hin	94
Abb.3.5.1 Aufbau der 3-Kompartimenten-Haut (3-K-Haut)	96
Abb.3.5.2 HE-Färbung der 2-Kompartimenten Haut	97
Abb. 3.5.3 Adhäsion von Endothelzellen an die 2-K-Haut	98
Abb.3.5.4. Immigrierte Vorläuferzellen in der 3-K-Haut	99
Abb.4.1 Modell für die Immigration der Monozyten-Subpopulationen in die Haut	108
Abb.4.2 Modell der möglichen Lokalisierung der CD34 ⁺ DC Subpopulationen in der Haut	111

1 Einleitung

1.1 Die menschliche Haut

Die menschliche Haut ist das größte Organ des Körpers; sie bildet die äußerste Barriere des Körpers zu seiner Umwelt und schützt den Körper vor mechanischen, chemischen und physikalischen Einwirkungen (UV-Strahlung). Darüber hinaus wird der von der Haut vermittelte Schutz durch das kutane Immunsystem verstärkt. Die Haut setzt sich aus drei funktionellen Schichten zusammen, die neben mechanischen und metabolischen Funktionen auch immunologische Aufgaben ausüben. Die oberste Schicht wird von einer sich ständig erneuernden Epidermis gebildet. Die Dermis ist die mechanisch gepufferte stabile Mittelschicht mit der darunterliegenden Hypodermis. Die intradermalen Blutgefäße versorgen zum einen die oberen Schichten mit Nährstoffen, zum anderen exprimieren die Endothelzellen konstitutiv Adhäsionsmoleküle und chemoattraktive Substanzen, die die Emigration von immunkompetenten Zellen in die Haut vermitteln.

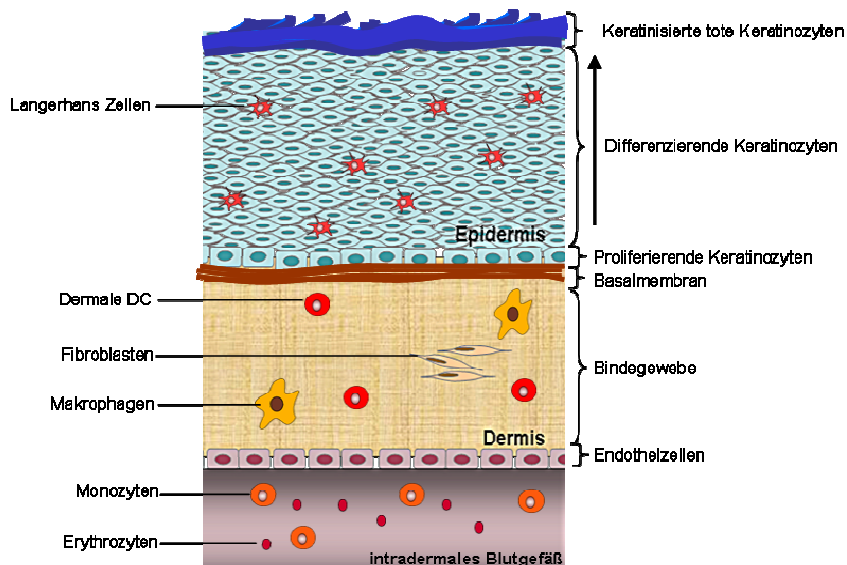


Abb.1.1 Schematischer Aufbau der menschlichen Haut

Die **Epidermis** ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das von den Keratinozyten gebildet wird. Die Epidermis enthält neben anderen intraepithelialen Lymphozyten die Langerhans Zellen als Vermittler der Immunabwehr. Da die Keratinozyten sich in einem ständigen Erneuerungs- und Abstoßungsprozess befinden, entstehen die unterschiedlichen Schichten in der Epidermis. Das *Stratum basale* ist die proliferative Schicht, in der die Keratinozyten-Stammzellen palisadenartig auf der Basalmembran

angeordnet sind. Im *Stratum spinosum* nehmen die Zellen an Größe zu und haben eine weniger regelmäßige Morphologie; in diesen Keratinozyten ist die Proteinbiosynthese deutlich stärker als in den Basalzellen.

Das *Stratum granulosum* stellt den Übergang von vitalen zu Biosynthese-inaktiven Keratinozyten dar. In der obersten Lage, dem *Stratum corneum* oder der Hornschicht, sind die Keratinozyten so miteinander vernetzt, dass eine stabile Barriere zur Umwelt entsteht. Die Einstellung der metabolischen Aktivität führt zum Verlust der desmosomalen Kontakte zwischen den Keratinozyten, wodurch die Hornzellen abgeschilfert werden können.

In der **Dermis** befindet sich das vaskuläre Netzwerk, über das die avaskuläre Epidermis mit Nährstoffen versorgt wird. Dermis und Epidermis sind durch die Basalmembran voneinander getrennt. Die Dermis ist aus einem dichten Netzwerk von verschiedensten extrazellulären Matrix-Proteinen aufgebaut, die von den in der Dermis eingelagerten Fibroblasten synthetisiert werden. In der Dermis finden sich weiterhin noch Mastzellen, Blut- und Lymphgefäße, Haarwurzeln und Nervenendigungen. Die Dermis kann durch einen vaskulären Plexus in *Stratum papillare* und *Stratum reticulare* unterteilt werden. Das *Stratum papillare* besteht aus einer lockeren extrazellulären Matrix (ECM) und ist über Papillaren mit der Epidermis verzahnt. Das *Stratum reticulare* wird aus unterschiedlich dichtem ECM-Gewebe aufgebaut, es vermittelt unter anderem durch das Protein Elastin die Elastizität der Dermis.

Die **Hypodermis** ist nicht klar strukturiert, sie verbindet die Dermis mit dem darunterliegenden Fettgewebe, in dem Adipozyten eingelagert sind. Das Fettgewebe schützt den Körper vor Wärmeverlust.

1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix ist ein Netzwerk aus extrazellulärem Material, das unterschiedliche Arten von Zellen in ihre unmittelbare Umgebung sezernieren. Langerhans Vorläuferzellen müssen auf dem Weg in die Epidermis durch Dermis migrieren, wobei sie mit den unterschiedlichen Proteinen der ECM in Kontakt treten. Die ECM verleiht dem Organismus durch ihre Struktur Festigkeit, aber auch Elastizität. Sie ist kein inertes Verpackungsmaterial für die Zellen, vielmehr werden über Zellinteraktionen mit der ECM und mit benachbarten Zellen verschiedenste Effekte hervorgerufen, die essentiell bei der Regulation und der Differenzierung der jeweiligen Zellen sind. Die ECM setzt sich aus fibrillären Glykoproteinen und Proteoglykanen zusammen, die durch wechselseitige Interaktionen zu einem dichten Netzwerk verknüpft sind. Im Folgendem soll auf die einzelnen Komponenten der ECM kurz eingegangen werden.

Die **Proteoglykane** beinhalten verschiedene Proteinfamilien, alle bestehen aus einem Proteinkern, der stark von Glykosaminoglykanen umgeben ist. Proteoglykane scheinen modulierend auf Zellmigration, Proliferation und Differenzierung während der Wundheilung und bei Tumorwachstum, Einfluss auszuüben (Bosman and Stamenkovic, 2003).

Die fibrillären **Glykoproteine** können ihrer Funktion entsprechend in zwei Untergruppen eingeteilt werden (Hamacher et al., 2004); zum einen in Strukturproteine, zu denen u. a. die Collagene zählen und zum anderen in Adhäsionsproteine, z.B. Fibronectin oder die Laminine. **Collagene** sind ubiquitär im Organismus der Vertebraten vorkommende Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Struktur des Organismus wesentlich sind (Bosman and Stamenkovic, 2003). Collagene werden hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert. Bisher konnten 20 genetisch unterschiedliche Collagene identifiziert werden, deren Verteilung im Organismus je nach Funktion unterschiedlich ist. In Geweben, die mechanische Aufgaben zu leisten haben, befinden sich die fibrillären Collagene, wie die Collagene I, II, III, V und XI. In der Basalmembran, einer besonderen Form der ECM, befindet sich hauptsächlich Collagen IV, das eine Art von Netz bildet. Collagen I ist nur im Knorpel nicht vorhanden, ansonsten ist es eines der Hauptcollagene in der Dermis.

Fibronectin besteht aus zwei ähnlichen, aber nicht identischen Polypeptiden, die über zwei Disulphid-Brücken in der Nähe des C-Terminus miteinander verknüpft sind. Die Polypeptide sind in 5-6 größere funktionelle Domänen unterteilt, die Bindungsepitope für andere ECM-Komponenten oder für Zelloberflächen darstellen. Eine dieser Bindungsdomänen ist die sogenannte RGD-Sequenz (arg-gly-asp), über die viele Integrine an Fibronectin binden (Romberger, 1997). Mit *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Fibronectin die Zellmigration förderte und darüber hinaus Chemotaxis und Haptotaxis verstärkte. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass das Vorkommen von Fibronectin mit Regionen starker Zellmigration während der Embryonalentwicklung assoziiert war, wie z.B. im Bereich des Rückenmarkes und des Magen-Darm-Traktes (Hynes and Yamada, 1982).

Die Familie der **Laminine** übernimmt vielfältige Funktionen bei der Bildung und Organisation von Basalmembranen in den meisten Geweben. Laminine sind verantwortlich für die Verankerung von Epithelzellen z.B. an die Basalmembranen. Laminine sind aus drei genetisch unterschiedlichen Ketten, den α , β , γ -Ketten, aufgebaut. Die Funktion der Laminine wird über die Bindung an Integrine vermittelt, wobei die Integrin-Bindungsdomänen hauptsächlich auf der α -Kette liegen. Bisher sind 15 verschiedene Heterotrimere bekannt (Schneider et al., 2006). Die Isoformen werden von den unterschiedlichsten Zellen in Abhängigkeit vom Gewebe synthetisiert. Alle Epithelzellen, wie auch viele Muskel-, Nerven-

und Endothelzellen, synthetisieren Laminine, die in die Basalmembranen abgegeben werden, wobei unter anderem Fibroblasten eine Rolle bei der Verflechtung der Lamine mit den Collagenen spielen (Elkhal et al., 2004). Von Laminin-1(Laminin 111) konnte gezeigt werden, dass es die Differenzierung von Epithelzellen induzierte. Laminin-5 (Laminin 332), bestehend aus $\alpha3\beta3\gamma2$, ist spezifisch für die Basalmembran unterhalb der Epidermis. Mit monoklonalen Antikörpern gegen die α -Kette wurde die Adhäsion von Keratinozyten aufgehoben, was zur De-Epithelisierung von Hautfragmenten führte (Rousselle et al., 1991). Potentielle Langerhans Vorläuferzellen etablieren nach der Diapedese in die Dermis Wechselwirkungen mit Proteinen der ECM. Diese Wechselwirkungen werden von Adhäsionsmolekülen auf den Vorläuferzellen vermittelt, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen werden soll.

1.3 Integrine

Auf die Proteinklasse der Integrine wird hier im Besonderen eingegangen, da sie entscheidende Funktionen bei Adhäsions- und Migrations-Prozessen von Zellen ausüben. Auf weitere Adhäsionsmoleküle wird in Abschnitt 1.5.4 eingegangen.

Integrine sind transmembrane, heterodimere Proteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Der C-Terminus der beiden Untereinheiten ist zytoplasmatisch lokalisiert, der N-Terminus liegt dagegen extrazellulär. Die α -Untereinheit beinhaltet die I-Domäne, die extrazellulär liegt und in der sich die sogenannte Metallionen-Bindungsstelle befindet. Die Adhäsion von Integrinen an die unterschiedlichen Liganden ist abhängig von der Bindung von zweiwertigen Kationen an diese Metallionen-Bindungsstelle (Hynes, 2002). Die β -Untereinheit ist weniger variabel als die α -Untereinheit, wobei sie eine ähnliche Domänenstruktur aufweist. Jede β -Untereinheit beinhaltet etwa 100 AS vom N-Terminus entfernt eine Bindungsstelle für zweiwertige Kationen. Da diese Bindungsstelle Ähnlichkeiten zu der I-Domäne der α -Untereinheit aufweist, wird sie auch I-ähnliche Domäne genannt (Berman et al., 2003).

Theoretisch könnten die bisher bekannten 24 α - und 9 β -Untereinheiten bis zu 100 Heterodimere bilden, bisher sind jedoch nur 24 Heterodimere nachgewiesen worden. Im Anhang in Tabelle V sind die Heterodimere und ihre Liganden aufgelistet.

Integrine sind in der Lage, die Adhäsion an die jeweiligen Liganden zu inhibieren, durch einen Prozess der als „inside-out signaling“ bezeichnet wird. Dabei werden durch Stimulierung anderer Zelloberflächenrezeptoren, z.B. Chemokinrezeptoren, intrazelluläre Signale initiiert, die auf die zytoplasmatischen Domänen wirken, wodurch die Adhäsion an

den extrazellulären Liganden verändert wird. Als „outside-in signaling“ wird die klassische Signaltransduktion bezeichnet, die durch Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne der Integrine induziert wird (Carman and Springer, 2003).

Das Prinzip der Zellmigration ist schematisch in Abb.1.2 dargestellt. Die Migration lässt sich in fünf unabhängige Einzelschritte einteilen, die sich zyklisch wiederholen. Während des ersten Schrittes erfolgen die Ausstreckung des Pseudopodiums und die Polarisierung der Zelle durch Actin-Polymerisierung. Im zweiten Schritt adhären die Pseudopodien durch Bildung von *Focal Adhesions* (FA) an die ECM. In einigen Fällen werden als dritter Schritt sich auf der Oberfläche der Zelle befindende Proteasen zu den Bindungsstellen rekrutiert, um mögliche Matrix-Barrieren zu verdauen. Im vierten Schritt wird der Zellkörper durch Actin/Myosin-Kontraktionen entlang des Gewebes gezogen. Im letzten Schritt wird das Zellende gelöst, und ein neuer Zyklus erfolgt (Wolf and Friedl, 2006).

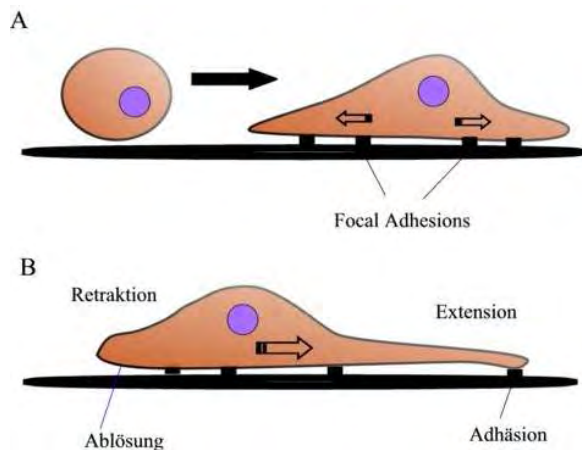


Abb.1.2 Schema der Zelladhäsion und Zellbewegung auf der ECM (nach (Gumbiner, 1996))

(A) Zelladhäsion ist assoziiert mit der Bildung von *Focal Adhesions* und hängt von der Reorganisation des Actin-Zytoskelettes der adhärenen Zelle ab. (B) Vereinfachte Darstellung des Zyklus der Zell-ECM Adhäsion und Ablösung während der Migration. Dabei wird unter anderem das Actin-Zytoskelett neuarrangiert.

1.4 Immunkompetente Zellen in der Haut

In der Haut befinden sich unterschiedliche immunkompetente Zellen je nach Kompartiment. In der Dermis sind dendritische Zellen (DC), Makrophagen, Mastzellen und infiltrierende T-Zellen zu finden. Spezifisch für die Epidermis sind die Langerhans Zellen, die sich in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis befinden und eine besondere Unterart der DC sind. Langerhans Zellen wurden 1868 das erste Mal von Paul Langerhans beobachtet, der sie wegen ihrer Morphologie als intraepitheliale Neronen definierte. Dermale DC (dDC)

wurden anfangs mit dermalen Fibroblasten verwechselt, bis sie als eine DC Subpopulation in der Dermis 1986 von Headington identifiziert wurden (Headington, 1986).

Um eine quantitative Verteilung der unterschiedlichen dermalen intertestinalen mononukleären Phagozyten-Populationen zu erhalten, führten Dupasquier et al. (2004) Immunfluoreszenz-Analysen der Dermis von Mäusen durch. Dabei exprimierten etwa 70% aller dermalen intertestinalen Zellen in der Maus den Panleukozytenmarker CD45, wobei 60% dieser Zellen die Marker CD11b und F4/80 exprimierten, durch die sie als mononukleäre Phagozyten definiert sind. Zu den mononukleären Phagozyten zählen die Makrophagen und dendritische Zellen. Den größten Anteil der mononukleären Phagozyten in der Mausdermis bildeten die Makrophagen (50%), die das C-Typ Lektin mMGL (murine macrophage galactose/N-acethylgalactosamine-specific C-type lectin) exprimierten, 7% waren dermale DC und 4% migrierende Langerhans Zellen (Dupasquier et al., 2004). In der humanen Haut werden Langerhans Zellen durch die Expression von Langerin/CD207 von den dDC unterschieden, dDc exprimieren dagegen den C-Typ Lektin Rezeptor DC-SIGN/CD209 (Dendritic-cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin). Die Funktion von Langerin ist bisher noch nicht aufgeklärt, wobei es mit den für Langerhans Zellen typischen Birbeck Granula colokalisiert ist. Es gibt Hinweise darauf, dass die Birbeck Granula als spezialisiertes Subkompartiment funktionieren, in dem die Langerin vermittelte CD1a abhängige Präsentation von Lipidantigenen dirigiert wird (Mizumoto and Takashima, 2004). An DC-SIGN binden ICAM-2 und ICAM-3, wie auch das gp120 des HIV-1 Virion (Figdor et al., 2002; Turville et al., 2002). Sowohl Langerhans Zellen wie auch dDC exprimieren CD1a (Koch et al., 2006). CD1a wurde daher in dieser Arbeit als Charakterisierungsmerkmal für DC definiert.

1.4.1 Funktion der dendritischen Zellen

DC gelten als Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort, wobei sie die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem darstellen.

Die DC sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung der Immunantwort, sie initiieren eine deutlich effektivere Immunantwort als andere antigenpräsentierende Zellen, wie Monozyten, B-Zellen und Makrophagen, in dem sie gerade auch naive T-Lymphozyten aktivieren können. Durch die Aufnahme von Pathogenen sezernieren DC proinflammatorische Zytokine und Chemokine, durch die andere Effektorzellen zu dem Entzündungsherd rekrutiert werden. Nach Aktivierung von aus Monozyten generierten DC (MoDC) mit TNF- α wurden durch die Sezernierung von

CXCL8/IL-8 polymorphonukleäre Leukozyten (PMNLs) rekrutiert und aktiviert (Scimone et al., 2005).

Die Aufnahme und Erkennung von Pathogenen kann unterschiedlich erfolgen. Zum einen werden opsonisierte Pathogene von Fc-Rezeptoren erkannt und internalisiert. Als ein Teil der angeborenen Immunität können DC mikrobielle Strukturen, genannt PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pattern) erkennen, die über die Toll-like Rezeptoren (TLR) gebunden werden, was zur Ausreifung der DC führt (Mazzoni and Segal, 2004).

Durch die Aufnahme von Antigenen wird die Ausreifung der DC induziert, wodurch unterschiedliche Prozesse hervorgerufen werden. Zum einen werden die internalisierten Antigene durch Proteasen gespalten und in speziellen Zellkompartimenten (MIIC) an „Major Histocompatibility Complex“ MHC-Klasse II Moleküle gebunden. Diese Peptid:MHC-Klasse II Molekülkomplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und dort stabil exprimiert. Parallel wird die Expression der Moleküle, die die Antigenaufnahme (u.a. die Fc-Rezeptoren) vermitteln, herunterreguliert. Weiterhin bewirkt die Ausreifung der DC Veränderungen im Zytoskelett, dem damit verbundenen Migrationsvermögen und dem Adhäsionsverhalten der Zellen. Nach Ausreifung mit LPS konnte gezeigt werden, dass die CD11b/CD18 und CD11c/CD18 vermittelte Adhäsion abnahm (Burns et al., 2004).

Neben der Veränderung der Expression der Adhäsionsmoleküle durch die Ausreifung der DC wird auch die Expression der Chemokinrezeptoren verändert. Die DC exprimieren nach Ausreifung vermehrt Chemokinrezeptoren, wie CCR7, die spezifisch lymphoide Chemokine (MIP-3 β /CCL19 und Exodus-2/CCL21) binden, wodurch reife DC über die afferenten Lymphgefäße in die peripheren Lymphknoten migrieren. In den Lymphknoten üben die maturaen DC ihre Hauptaufgabe aus, in dem sie die prozessierten Antigene den naiven T-Lymphozyten präsentieren.

Die Aktivierung der T-Zellen ist der entscheidende Schritt bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Es werden drei unterschiedliche Signale benötigt, um die T-Zellen effizient zu aktivieren. T-Zellen erkennen das spezifische Antigen nur, wenn es als Peptid in den MHC-Klasse I (für CD8_{pos} T-Zellen) oder in den MHC-Klasse II (für CD4_{pos} T-Zellen) Molekülen gebunden präsentiert wird. Weiterhin werden zur Aktivierung der T-Zellen noch costimulatorische Moleküle benötigt, deren Expression durch Reifung in den DC induziert werden. Dies ist einer der Gründe, warum T-Zellen in der Peripherie nicht von unreifen DC aktiviert werden können. Als drittes Signal wirken von den DC sezernierte Zytokine und Chemokine auf die T-Zellen ein, wodurch die Art der Immunantwort der T-Zellen von den DC direkt beeinflusst wird (Steinman et al., 1999).

1.4.2 Funktion der Langerhans Zellen

Obwohl die Langerhans Zellen ebenfalls DC sind, scheinen sie andere immunologische Aufgaben als die dDC auszuüben, was sich in den letzten Jahren manifestiert hat. Es konnte gezeigt werden, dass Langerhans Zellen für die anti-virale Immunität entbehrlich sind. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Infektion der Epidermis mit *Herpes simplex* Virus nicht zu einer Langerhans Zellen-induzierten zytotoxischen T-Zellantwort führte, diese wurde durch eine CD8 α^+ DC Subpopulation initiiert (Allan et al., 2003). Obwohl Langerhans Zellen der Maus TLR3 exprimierten und somit auf doppelsträngige RNA (dsRNA) reagieren können, war die Ausreifung der Langerhans Zellen als Antwort auf die Stimulation mit Poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid, einem synthetischem dsRNA Äquivalent) nur sehr gering (Fujita et al., 2004).

Anscheinend ist auch die Erkennung von bakteriellen Stimuli durch Langerhans Zellen schwächer als durch DC. Flacher et al. (2006) konnte die mRNA von den TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 and TLR10 in frisch isolierten humanen Langerhans Zellen nachweisen, und auch deren Funktionalität bestätigen (Flacher et al., 2006). Diese Daten stehen zum Teil im Gegensatz zu den Ergebnissen von van der Aar et al. (2007), die die mRNA Expression in frisch isolierten humanen Langerhans Zellen und in MoLC (aus Monozyten generierte Langerhans Zellen) untersuchten. Sie konnten höchstens eine schwache Expression von TLR2, TLR4, and TLR5 nachweisen, wodurch die Antwort von den MoLC auf die bakteriellen TLR-Antagonisten nur sehr gering ausfiel (van der Aar et al., 2007).

Kissenpfennig et al. (2005b) zeigte, dass Langerhans Zellen bei der Entstehung der Kontakthypersensibilität ebenfalls keine wesentliche Rolle spielen. Sie konstruierten eine Knock-in Maus, in der die eGFP (enhanced green fluorescent protein) cDNA und die Diphtherie-Toxin Rezeptor cDNA unter die Kontrolle des *langerin* Gens kloniert wurden. Durch die Zugabe des Diphtherie-Toxins wurden so selektiv die Langerin positiven Langerhans Zellen in der Maus eliminiert. Dies wirkte sich nicht auf die Entstehung der Kontakthypersensibilität aus (Kissenpfennig et al., 2005a). Über die eigentliche immunologische Funktion der Langerhans Zellen kann bis zu diesem Zeitpunkt aus den oben genannten Gründen nur spekuliert werden.

1.4.3 Ontogenese der Langerhans Zellen und der dermalen dendritischen Zellen

Eindeutig konnte durch Knochenmarkstransplantationen bewiesen werden, dass Langerhans Zellen von haematopoetischer Abstammung sind (Katz et al., 1979; Perreault et al., 1984). Obwohl danach in vielen Experimenten Sicherheit darüber gewonnen wurde, dass Langerhans

Zellen konstant durch zirkulierende Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark abstammen, ersetzt werden, sind die Mechanismen der Immigration in die Haut im ruhenden Zustand bisher nicht genau geklärt. Viele Erkenntnisse über die Entwicklung der humanen DC und Langerhans Zellen wurden in *in vitro* Experimenten gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten des peripheren Blutes in großen Mengen unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF in DC differenzierten (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Caux et al. (1992) konnten demonstrieren, dass CD34_{pos} Stammzellen aus dem Nabelschnurblut *in vitro* zu Langerhans Zellähnlichen Zellen durch Zugabe von GM-CSF und TNF- α differenzierten (Caux et al., 1992).

Zytokine bei der Langerhans Zellentwicklung

Die Zugabe von **GM-CSF** ist bei der *in vitro* Differenzierung von DC am häufigsten beschrieben worden. Dennoch konnte in Mäusen, die den Rezeptor für GM-CSF nicht exprimierten, sowie in Mäusen, die kein GM-CSF synthetisieren konnten, keine Veränderung in der Anzahl der DC im Lymphgewebe nachgewiesen werden (Vremec et al., 1997).

TGF- β 1 ist wesentlich an der Differenzierung von Langerhans Zellen beteiligt. In der TGF- β 1 defizienten Maus konnten keine Langerhans Zellen nachgewiesen werden (Borkowski et al., 1996). TGF- β 1 wird sowohl von den Langerhans Zellen selber produziert, aber auch konstitutiv von Keratinozyten (Gruschwitz and Hornstein, 1992).

FLT-3L scheint dagegen essentiell für die Differenzierung von haematopoetischen Stammzellen zu DC zu sein. FLT-3L defiziente Mäuse hatten deutlich reduzierte Mengen von DC, wie auch solche Mäuse, die STAT3 (signal transducer and activator of transcription3) defizient waren. STAT3 ist ein wichtiges Molekül bei der Signaltransduktion induziert durch FLT-3L (Shortman and Naik, 2007).

M-CSF ist ein kontrovers diskutiertes Zytokin bei der Entwicklung der DC. In Mäusen, die den M-CSF Rezeptor nicht exprimierten, konnten keine Langerhans Zellen in der Haut im ruhendem Zustand nachgewiesen werden. Ebenso waren diese Mäuse nicht in der Lage, die Epidermis nach Entzündung mit Langerhans Zellen zu repopularisieren (Ginhoux et al., 2006). Humane CD34_{pos} Stammzellen differenzierten durch M-CSF zu CD14_{pos} dDC, die durch Zugabe von TGF- β 1 und GM-CSF zu Langerhans Zellähnlichen Zellen differenzierten (Barbaroux et al., 2006; Mollah et al., 2003). Dagegen stehen Arbeiten, in denen Monozyten durch Stimulation mit M-CSF zu Makrophagen differenzierten (Chomarat et al., 2003; Sunderkotter et al., 2004).

Als weiteres Zytokin wurde **IL-15** identifiziert, das die Differenzierung von Monozyten zu DC induzierte, die einen ähnlichen Phänotyp wie Langerhans Zellen hatten. Die IL-2 γ Kette ist ein Bestandteil des IL-15 Rezeptors, wie auch des IL-4 Rezeptors. IL-15 wird von Keratinozyten konstitutiv exprimiert (Chomarat et al., 2003; Mohamadzadeh et al., 2001).

Diese beschriebenen Zytokine zeigen auf, wie sensitiv und abgestimmt die Differenzierung von Vorläuferzellen zu DC und Langerhans Zellen ist und wie individuell die Zytokine unter den jeweiligen Versuchsbedingungen auf die Differenzierung wirkten. Bei *in vitro* Experimenten muss bei allen Untersuchungen die Isolierung der Vorläuferzellen berücksichtigt werden, da ungewollte Differenzierungen induziert werden könnten.

Unterschiedliche Monozytenpopulationen als DC Vorläuferzellen

Monozyten gehören zu dem mononukleären Phagozytensystem und wurden ursprünglich als zirkulierende Vorläuferzellen für Gewebsmakrophagen beschrieben. In den letzten Jahren wurden zwei Subpopulationen innerhalb der Monozyten sowohl bei der Maus, der Ratte, als auch beim Menschen beschrieben (Gordon and Taylor, 2005).

Alle Monozyten exprimieren CD14, das ein Teil des Rezeptors für LPS ist. Aufgrund der unterschiedlichen Stärke der Expression von CD14 auf den Monozyten und der Expression von CD16, dem Fc γ -Rezeptor III, können humane Monozyten in die CD14_{high}CD16_{low} und eine CD14_{low}CD16_{high} Populationen unterteilt werden, wobei die CD14 stark exprimierende Population den größten Anteil der Monozyten darstellt. Diese beiden Populationen korrespondieren zu den CCR2_{high}CX₃CR1_{low}Gr1_{high} und den CCR2_{neg}CX₃CR1_{high}Gr1_{low} Monozyten in der Maus. Die Monozyten können nicht nur aufgrund des Phänotypes unterschieden werden, die beiden Populationen unterschieden sich auch in ihrer Funktion. Geissmann et al. (2003) bewiesen, dass die CCR2_{high}CX₃CR1_{low}Gr1_{high} Monozyten präferiert in entzündete Gewebe immigrieren, um dort zu Makrophagen oder DC zu differenzieren, die dort die Immunantwort induzierten. Sie werden daher als inflammatorische Monozyten definiert. Die länger lebenden CCR2_{neg}CX₃CR1_{high}Gr1_{low} Monozyten werden als residente Monozyten definiert, da sie in ruhende Haut immigrierten (Geissmann et al., 2003; Yrlid et al., 2006). Beide Monozytenpopulationen differenzierten mit GM-CSF und IL-4 zu DC, zeigten jedoch unterschiedliches Vermögen, CD4_{pos} T-Lymphozyten zu stimulieren (Sanchez-Torres et al., 2001). Weiterhin gibt es die Hypothese, dass die residenten Monozyten ein intermediäres Stadium zwischen Monozyten und DC darstellen (Grage-Griebenow et al., 2001; Sunderkotter et al., 2004).

Eine weitere Subpopulation der mononukleären Zellen, die CD14_{pos}CD34_{pos} Zellen, differenzierte nach transendothelialer Migration unter Zugabe von GM-CSF ebenfalls zu immunstimulatorischen DC (Ferrero et al., 1998).

Herkunft der Langerhans Vorläuferzellen

In der ruhenden Haut ist der Umsatz der Langerhans Zellen sehr gering. Es gibt unterschiedliche Befunde für die Hypothese, dass Langerhans Zellen in der ruhenden Haut durch lokale proliferierende Vorläuferzellen ersetzt werden. Die ersten *in vivo* Befunde, die zu dieser Hypothese führten, wurden von Merad et al. (2002) in einem Mausmodell gewonnen. Sie transplantierten Knochenmark in eine mit einer tödlichen Dosis bestrahlte Maus. Nach 18 Monaten hatten die Langerhans Zellen dieser Maus noch den Haplotyp des eigenen Knochenmarks, wohingegen die DC der anderen Organe den Haplotyp des Spenderknochenmarks trugen (Merad et al., 2002). Diese Ergebnisse korrespondieren mit Ergebnissen, die von Kanitakis et al. (2004) beschrieben wurden. Sie konnten in der transplantierten Hand eines Menschen 4,5 Jahre nach Operation keine Langerhans Zellen entdecken, die vom Knochenmark des Empfängers stammten (Kanitakis et al., 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aus humanen CD14_{pos} CD1a_{neg} HLA-DR_{pos} dermalen DC unter dem Einfluss von TGF- β direkt Zellen mit Langerhans Zellen-spezifischen Charakteristika differenzieren können (Larregina et al., 2001). Eine besondere Subpopulation von DC im Blut, die CD1a_{pos}CD11c_{pos} DC, konnte durch Zugabe von GM-CSF, IL-4 und TGF- β in Zellen differenzieren, die einen Langerhans Zellen-spezifischen Phänotyp aufwiesen (Ito et al., 1999).

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines dermalen proliferierenden Vorläufers, der einen dendritischen Phänotyp aufweist, gaben die Ergebnisse von Bogunovic et al. (2006). In der Haut von Mäusen und Menschen konnten 2-3% der dermalen DC als proliferierende DC identifiziert werden, aus denen möglicherweise Langerhans Zellen differenzieren können (Bogunovic et al., 2006).

Im Mausmodell und im humanen System konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten direkt Langerhans Vorläuferzellen entstehen können. In der Maus waren es die CCR2_{high}CX₃CR1_{low}Gr1_{high} inflammatorischen Monozyten, die nach UV-Bestrahlung in die der Haut immigrierten und zu Langerhans Vorläuferzellen differenzierten (Ginhoux et al., 2006). Dieses Ergebnis passt zu dem Befund, dass humane CD14_{high}CD16_{low} Monozyten in ein humanes *in vitro* Hautäquivalent immigrierten und zu funktionell Langerhans Zellen-ähnlichen DC differenzierten (Schaerli et al., 2005).

Die Ontogenese der Langerhans Zellen und auch der dermalen DC ist trotz der oben beschriebenen Befunde noch nicht endgültig geklärt, diese Frage liegt daher dieser vorliegenden Arbeit zugrunde.

1.4.4 Migration von Langerhans Vorläuferzellen

Auf ihrem Weg aus den Blutgefäßen passieren die Langerhans Vorläuferzellen das vaskuläre Endothel und die dermale Matrix, bevor sie in die Epidermis gelangen. Adhäsionsmoleküle vermitteln und kontrollieren durch interzelluläre Kontakte die einzelnen Schritte der Vorläuferzellen. Auf den Ablauf dieser Schritte soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

Transendotheliale Migration

Der erste Schritt der Migration, den die Langerhans Vorläuferzellen absolvieren müssen, ist die Emigration aus den Blutgefäßen entlang der endothelialen Schicht in die Dermis.

Die Auswanderung aus den Blutgefäßen ist in mehrere Teilschritte unterteilt, dargestellt in Abb.1.3..

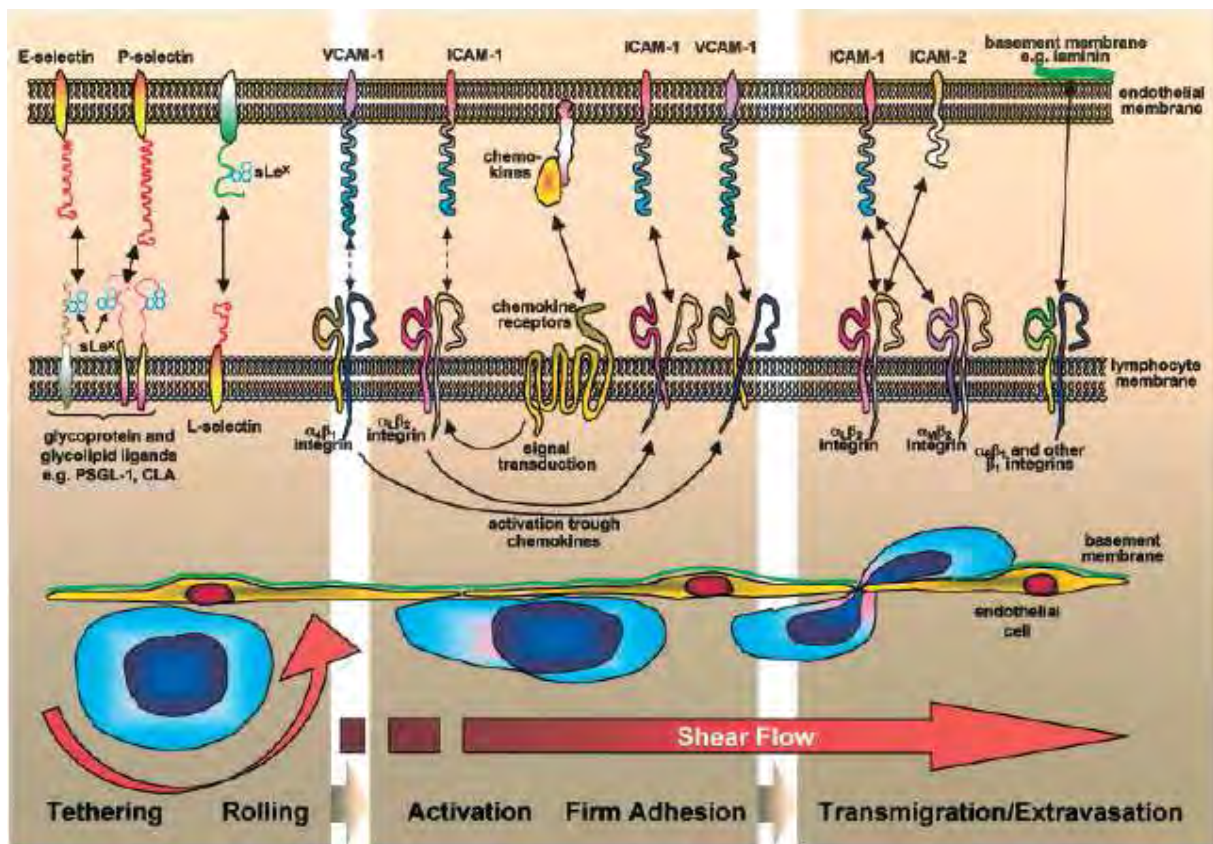


Abb.1.3 Schema der Auswanderung von Leukozyten in die Haut (Schoen et al., 2003)

Im unteren Teil des Schemas sind die einzelnen Schritte und die Interaktion mit den Endothelzellen skizziert. Der obere Teil zeigt die Interaktionen zwischen einigen Molekülen auf den Leukozyten und auf den Endothelzellen.

Im ersten Schritt erfolgt die Verlangsamung der Vorläuferzellen im Verhältnis zum Blutstrom. Dieser Schritt wird durch Wechselwirkung zwischen Selektinen wie P-Selektin (CD62L) oder E-Selektin (CD62E) auf den Endothelzellen und Glykoproteinen bzw. glykolipiden Liganden wie PSGL-1 (P-Selektin Glycoprotein Ligand-1) oder CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) auf den Vorläuferzellen vermittelt. Diese Interaktion kann durch die Wechselwirkung von Chemokinen mit ihren Rezeptoren direkt manipuliert werden (Grabovsky et al., 2000).

CD14^{high} Monozyten exprimieren L-Selektin (CD62L), das mit Liganden auf den Endothelzellen interagiert. Durch Abschneiden von L-Selektin auf der Leukozytenoberfläche werden diese Interaktionen reguliert (Imhof and Aurrand-Lions, 2004). Wurde das Abschneiden von L-Selektin inhibiert, führte das zu einer verstärkten Interaktion zwischen CD11a/CD18 und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), wodurch die Zellen an die Endothelzellen adhärten und transmigrierten (Schoen et al., 2003).

Im zweiten Schritt findet das verlangsamte Rollen entlang der Endothelzellen im Blutgefäß statt. Zum einen wird dies von L-Selektin vermittelt (siehe Absatz oben), zum anderen über die Wechselwirkung von Integrin CD49d/CD29 (VLA-4) und den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1). Das Rollen entlang der Endothelzellen bringt die Zellmembran in räumliche Nähe zu der Endothelzellmembran, auf der Chemokine gebunden sind, z.B. CCL5 gebunden an Syndecan-4 (einem Heparinsulfat) oder dort direkt als Membranprotein vorliegen. Indem die Monozyten über die Endothelzellen rollen, interagieren ihre Chemokinrezeptoren mit den gebundenen Chemokinen, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden in den Monozyten induziert werden, die zur Aktivierung der Integrine führen (Shamri et al., 2005).

Zusätzlich wurde das humane DC-spezifische C-Typ Lectin DC-SIGN identifiziert. Dessen Interaktion mit ICAM-2 auf den Endothelzellen führte zum Anheften und Rollen der DC entlang der Endothelzellen (Geijtenbeek et al., 2000a; Geijtenbeek et al., 2000b).

Die Aktivierung der Integrine führt zum nächsten Schritt, der festen Adhäsion an die Endothelzellen. Die Adhäsion der Langerhans Vorläuferzellen wird hauptsächlich durch die Bindung der Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) an ICAM-1 und CD49d/CD29 an VCAM-1 vermittelt. Allerdings war auch das Integrin CD11b/CD18 (MAC-1) und das Adhäsionsmolekül CD36 an der Adhäsion von CD34⁺DC an dermale Endothelzellen beteiligt (Nguyen et al., 2002).

Die Diapedese stellt den letzten Schritt der Immigration in das Gewebe dar. Dafür wandern die Leukozyten hauptsächlich entlang der luminalen Seite der vaskulären Endothelzellen, um dann zwischen zwei benachbarten Zellen zu traversieren.

Diapedese von Monozyten ist abhängig von der Interaktion von CD11a/CD18 und CD11b/CD18 mit ICAM-1 und ICAM-2 (Mazzone and Ricevuti, 1995).

Reguliert wird die Diapedese durch zwei verschiedene Moleküle: PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1/ CD31) und CD99, ein O-glykosiliertes 32kDa Typ I Membranprotein. PECAM-1 Moleküle ermöglichen homodimere Interaktionen zwischen migrierenden Leukozyten und Endothelzellen. Durch diese Interaktionen werden Integrine aktiviert, wodurch sie an endotheliale Liganden ICAM-1/2, VCAM-1 oder an junctional adhesion molecules (JAM) binden. Die Leukozyten bewegen sich dadurch in amöboider Art zwischen zwei benachbarten Endothelzellen hindurch (Imhof and Aurrand-Lions, 2004).

Durch die Inhibition von PECAM-1 blieben Monozyten an der apikalen Oberfläche der Endothelzellen haften. Dagegen bewirkte die Inhibition von CD99 eine unvollständige Diapedese; die Monozyten blieben zwischen den Endothelzellen hängen (Ferrero et al., 1998; Schenkel et al., 2002). Diapedese ist ein schneller Prozess, nach ca. 90 sec. sind Leukozyten nach Adhäsion an die Endothelzellen transmigriert (Mamdouh et al., 2003).

Die Diapedese von CD14_{pos}CD34_{pos} Vorläuferzellen war von PECAM-1 abhängig. Nachdem diese Zellen mit GM-CSF zu DC differenziert waren, konnten sie PECAM-1 und VCAM-1 zur transendothelialer Migration einsetzen (Ferrero et al., 1998).

DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1/ CD266), ein transmembranes Glykoprotein, ist ebenfalls über die Interaktion mit CD155 (PVR/ Poliovirus Rezeptor) in die Transmigration von Monozyten involviert. Dies konnte durch die spezifische Blockierung von CD155 und DNAM-1 *in vitro* gezeigt werden (Reymond et al., 2004).

Weitere Moleküle, die bei der Auswanderung der Vorläuferzellen aus dem Blut eine Rolle spielen, sind die Familie der junctional adhesion molecule (JAM), die zu der Immunglobulin Supergenfamilie gehören. JAM-A war das erste Protein dieser Molekülfamilie, das kloniert wurde. Es wird auf einer Vielzahl von Leukozyten, wie Monozyten, neutrophilen Zellen, B- und T- Lymphozyten exprimiert (Ebnet et al., 2004).

Durch Blockierung von JAM-A wurde die transendotheliale Migration von Monozyten und Makrophagen *in vitro* inhibiert (Martin-Padura et al., 1998). JAM-A bildet homodimere Interaktionen aus, kann aber auch an CD11a/CD18 binden. Endothelzellen exprimieren JAM-B, das mit CD49d/CD29 auf den Monozyten interagieren kann (Ebnet et al., 2004).

Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis

Im Gegensatz zu der transendothelialen Migration ist über die Immigration in die Epidermis relativ wenig bekannt. Abb.1.4 zeigt schematisch die Immigration von T-Lymphozyten, wobei Ähnlichkeiten zu der Immigration von Langerhans Zellen bestehen. Langerhans Vorläuferzellen befinden sich in der Dermis (CD14_{pos} DC), wo sie über Integrine an Proteine der ECM gebunden sind. In der entzündeten Haut von Psoriasis-Patienten (Schuppenflechte) konnte die *de novo* Expression von ICAM-1 beobachtet werden, das ein Bindungspartner von CD11a/CD18 ist. Welche Moleküle die Adhäsion an die epidermale Basalmembran vermitteln und welche Adhäsionsmoleküle die Immigration in die Epidermis vermitteln, ist bisher noch unklar. Sicher jedoch ist, dass Langerhans Zellen über E-Cadherin an Keratinozyten gebunden sind und dass bei Aktivierung der Langerhans Zellen die Expression von E-Cadherin herunterreguliert wird (Schwarzenberger and Udey, 1996; Tang et al., 1993).

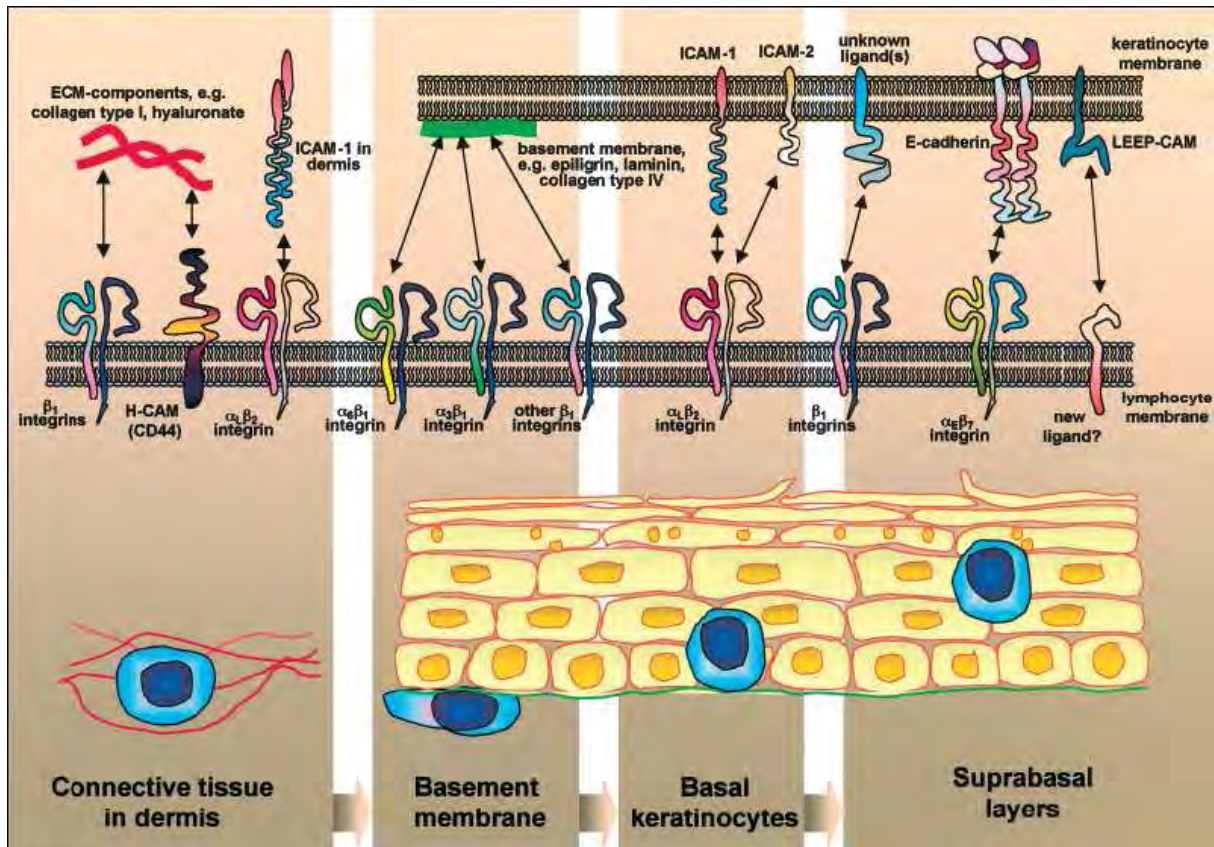


Abb.1.4. Schema der Einwanderung von Leukozyten in die Epidermis (Schoen et al., 2003)

Im unteren Teil des Schemas sind die einzelnen Schritte und die Interaktion mit der Basalmembran und den Keratinozyten skizziert. Der obere Teil zeigt die Interaktionen zwischen einigen Molekülen auf den Leukozyten und auf den Keratinozyten.

1.5 Die Rolle von Chemokinen bei der Immigration von Vorläuferzellen der dermalen DC und Langerhans Zellen

Chemokine sind chemoattraktive Moleküle, die lokal in den Geweben produziert werden und die Migration von Leukozyten steuern (Yoshie, 2000). In der Familie der Chemokine sind 8-14 kDa große strukturell verwandte Proteine vereinigt. Sie bestehen aus vielen positiv geladenen Aminosäuren, über die sie an die negativ geladenen Zelloberflächen und an Proteine der ECM binden. Zwei Chemokine, CXCL16 und CX₃CL1/Fractalkine, haben eine Transmembran-Domäne am C-Terminus, über die sie an der Zelloberfläche präsentiert werden, wodurch sie den Charakter eines Adhäsionsmoleküls bekommen. Die systematische Namensgebung der Chemokine basiert auf der Anzahl und dem Abstand zweier Cysteinreste am N-Terminus des Polypeptides, dadurch entstehen vier Unterklassen. Die größte Klasse umfasst die CC-Klasse mit 28 Chemokinen. Die CXC-Klasse kann durch eine ELR-Sequenz (Glutaminsäure, Leucin und Arginin) in zwei Untergruppen geteilt werden. Die ELR exprimierende Untergruppe zeigt Angiogenese-hemmende Wirkung und bindet an die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 (Rossi and Zlotnik, 2000).

Chemokine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sieben Transmembran-Domänen besitzen und an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Bislang sind 19 Chemokinrezeptoren identifiziert worden, wobei die meisten Chemokinrezeptoren mehrere Liganden haben. Rezeptoren, welche CXC-Chemokine binden, werden als CXCR bezeichnet, analog dazu werden CC-Chemokine bindende Rezeptoren mit CCR abgekürzt. Eine Liste mit einigen Chemokinen und ihren Rezeptoren ist in Tabelle VI im Anhang zu finden. Nachdem Chemokinrezeptoren durch die Bindung eines Liganden aktiviert wurden, werden sie sehr schnell desensibilisiert und internalisiert. Spezielle Kinasen phosphorylieren die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors, wodurch er innerhalb von 30 sec. desensibilisiert wird (Kim, 2004).

Humane periphere Monozyten exprimieren CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR4 und CX₃CR1 (Geissmann et al., 2003; Kim, 2004). Die Differenzierung zu Makrophagen führt zum Verlust von CCR2 und CCR3 auf der Zelloberfläche, wobei Makrophagen CCR1, CCR4, CCR5 und CX₃CR1 weiter exprimieren (Fantuzzi et al., 1999). Von Fractalkine/CX₃CL1 konnte gezeigt werden, dass es bei der Immigration von Monozyten in die ruhende Haut eine Rolle spielt, da besonders die CD16_{high} Monozyten auf das membrangebundene Chemokin reagierten (Ancuta et al., 2003). Ähnlich dem CX₃CL1 konnte auch MIP-1 α /CCL3 die transendotheliale Migration von CD16_{high} Monozyten induzieren, wodurch MIP-1 α ein weiteres Chemokin darstellt, durch das die Homeostase der DC in der

ruhenden Haut aufrecht erhalten wird. Interessanterweise sezernieren Langerhans Zellen MIP-1 α , wodurch sie die Rekrutierung ihrer Vorläuferzellen direkt beeinflussen (Muller, 2001; Sozzani et al., 2000).

Ein weiteres Chemokin, das konstitutiv von Keratinozyten exprimiert wird, ist BRAK/CXCL14, das möglicherweise eine Rolle bei der Homeostase von dDC eine Rolle spielt. In Transwell-Migrationsexperimenten migrierten sowohl CD14_{high} Monozyten, als auch CD14_{pos} CD34DC auf BRAK zu (Schaerli et al., 2005). Der Rezeptor für BRAK konnte bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

Das am häufigsten beschriebene Chemokin bei der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis ist MIP-3 α /CCL20. Der spezifische Rezeptor für MIP-3 α ist CCR6, der auf unreifen DC und Langerhans Zellen exprimiert ist. MIP-3 α wurde als das Chemokin beschrieben, das die stärkste Migration von CD34DC auslöste. MIP-3 α wird konstitutiv von Keratinozyten exprimiert, die Expression wurde durch diverse proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β und IFN- γ) verstärkt (Schutyser et al., 2003).

In CCR6 defizienten Mäusen war die Anzahl der dDC nicht beeinträchtigt, hingegen war die Rekrutierung der Langerhans Zellen nach Inflammation stark beeinflusst (Merad et al., 2004). Die Rekrutierung von DC Vorläuferzellen in die entzündete Haut scheint dagegen wesentlich von der Expression des Chemokinrezeptors CCR2 abzuhängen. So hatten CCR2 defiziente Mäuse deutlich weniger zirkulierende inflammatorische Monozyten (Gr1_{high} Monozyten) im Blut, da sich nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* die aktivierten Monozyten im Knochenmark anhäufte. Solche Mäuse konnten nach UV Bestrahlung die Dermis weder mit DC noch mit Langerhans Zellen repopularisieren (Bogunovic et al., 2006; Serbina and Pamer, 2006). Weiterhin konnten in einer mit CCR2^{-/-} Knochenmark transplantierten chimären Maus keine Langerhans Zellen in der Epidermis gefunden werden. (Merad et al., 2002)

In vitro reagierten unreife DC und Langerhans Zellen auf ein großes Repertoire von CC und CXC Chemokinen, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-4, MIP-3 α und SDF-1, aber auch auf den Komplementfaktor 5a (C5a) und auf bakterielles fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) (Sozzani et al., 2000).

Während der Reifung von DC ändert sich ihr Chemokinrezeptor Repertoire. Die Expression von CCR6 wird herunterreguliert und die ausreifenden DC beginnen, CCR7 zu exprimieren und auf die Liganden von CCR7, MIP-3 β /CCL19 und SLC/CCL21 hin migrieren. Diese beiden Chemokine werden unter anderem von den HEV (high endothelial venules) in den T-

Zell-Bereichen der Lymphknoten exprimiert, daher immigrierten die reifen DC in diesen Bereich (Kimber et al., 2000).

DC Adhäsion und Transmigration war deutlich verstärkt, nachdem die Endothelzellen unterschiedlich stimuliert wurden (Weis et al., 2002). Dieser Befund unterstreicht die Wichtigkeit der lokalen Präsenz von Chemokinen in oder in der Nähe der Endothelzellen für die Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Dermis.

1.6 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Ontogenese der Langerhans Zellen und die molekularen Mechanismen, die der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis zu Grunde liegen, untersucht werden. Der Großteil der Erkenntnisse zur Herkunft der humanen Langerhans Zellen ist entweder mit CD34_{pos} Stammzellen oder mit Monozyten als Vorläuferzellen erlangt worden. Daher sollte zunächst der Phänotyp der CD34DC mit dem von Monozyten des peripheren Blutes und MoDC verglichen werden. Dabei sollte der Schwerpunkt auf der Untersuchungen der Expression von Adhäsionsmolekülen und von Chemokinrezeptoren liegen, da unter Beteiligung dieser beiden Molekülgruppen die Vorläuferzellen in die Dermis und die Epidermis dirigiert werden.

Der Einfluss dermalen und epidermalen Zellen und der von diesen sezernierten Faktoren auf Differenzierung und Immigration der Langerhans Vorläuferzellen sollte in einem *in vitro* Migrations-Modell untersucht werden. Von besonderem Interesse hierbei sollten von unstimulierten Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten stammende Faktoren sein, da diese vermutlich die Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in der Abwesenheit von inflammatorischen Signalen kontrollieren. Konditionierte Medien von ruhenden Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sollten deshalb immunchemisch und funktionell auf chemoattraktive Substanzen für Langerhans Vorläuferzellen untersucht werden. Dabei stellte sich die Frage, ob diese auf spezielle Attraktantien gerichtete Chemotaxis möglicherweise Signale induziert, die zur Differenzierung hin zu Langerhans Zellen führen.

Um die Untersuchung der Mechanismen der Immigration näher an die *in vivo* Situation anzupassen, sollte ein Hautmodell bestehend aus den drei Zellkompartimenten (Endothel, Dermis, Epidermis) konstruiert werden, in dem anschließend die Migration der verschiedenen Vorläuferzellen untersucht werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

NaCL	8,0 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH und 1M HCL eingestellt. Der Puffer wurde autoklaviert.

Trisgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,6

0,5 M Stamm-Lösung, pH 7,6

Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan	60,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit 25 % HCL Lösung eingestellt.

Gebrauchslösung

0,9 % NaCL-Lösung	950 ml
Tris-Stammlösung	50 ml

FACS-Puffer (10fach), pH 7,4

NaCL	42,5 g
Na ₂ HPO ₄	5,35 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,24 g
dest H ₂ O	ad 375 ml
Hitze-inaktiviertes FCS	50 ml
NaN ₃	5 g
Aqua bidest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH und 1M HCL eingestellt. Der Puffer wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

MACS-Puffer

NaCL	8,0 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
BSA	5,0 g
0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)	10 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der Puffer wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

TAE-Puffer (50fach)

Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)	100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der Puffer wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Gel-Ladepuffer (6fach)

Bromphenolblau	0,25%
Xylen Cyanol FF	0,25%
Ficoll	15%

0,5 M EDTA-Lösung, pH 8

93,06 g EDTA wurden in ca. 400 ml Aqua bidest. eingerührt und mit 10 N NaOH-Lösung auf pH 8 eingestellt (Lösung des EDTA). Anschließend wurde Aqua bidest. ad 500 ml aufgefüllt und die Lösung durch Filter (0,2 µm) sterilfiltriert.

Waschpuffer für die Isolierung von Monozyten

NaCL	9 g
BSA	10 g
0,5 M EDTA-Lösung	3,4 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der Puffer wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

8% Dextran-Lösung

Dextran 500	8,0 g
NaCL	0,54 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lösung wurde autoklaviert.

2.2 Herkunft häufig verwendeter Reagenzien und Geräte

Chemikalien

2-Mercaptoethanol (β -Me)	Sigma, Taufkirchen
Adenin Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
BPE	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY
Dextran 500	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EGF	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
FLT-3	R&D Systems, Wiesbaden
Gentamycin	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
GM-CSF	Leukine Sargramostim, Berlex Laboratories, Richmond
Heparin-Natrium	Liquemin, Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Humanes Transferrin	Sigma, Taufkirchen
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen
IL-4	Strathmann Biotech, Hannover
Insulin	Sigma, Taufkirchen

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma, Taufkirchen
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Lymphoprep	AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
MCP-1	PeproTech Inc., NJ, USA
MCP-4	PeproTech Inc., NJ, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MIP-3 α	R&D Systems, Wiesbaden
MMLV-RT	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid(NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Nycoprep 1.068	AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Random primers	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
RNasin	Promega, Mannheim
Salzsäure (37%)	Merck, Darmstadt
SCF	R&D Systems, Wiesbaden
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TGF- β	R&D Systems, Wiesbaden
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden
Triiodothyronin	Sigma, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)amino-methan (Tris)	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIZol	Invitrogen, Karlsruhe
 Geräte und Verbrauchsmaterialien	
5 ml, 10 ml, 25 ml Serological Pipet	Falcon (BD), Heidelberg
-70°C Herafreeze	Heraeus (Kendro), Hanau
Autoklav Varioklav 500	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

AUTOMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Biofuge fresco	Heraeus (Kendro), Hanau
Durchflusszytometer FACSCanto	BD, Heidelberg
Ealge-Eye II	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
ELISA-Reader (EL800)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
ELISA-Washer (ELx50)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Färbeautomat für HE-Färbung	Tissue Stainer TST50, Medite, Burgdorf
Färbeautomat für immunhistologische Färbung	DAKO Autostainer, Hamburg
GenAmp PCR system 9600	Applied Biosystem, Weiterstadt
Inkubatoren HeraCell	Heraeus (Kendro), Hanau
Invertierendes Mikroskop DMIRD	Leica, Bensheim
Invertierendes Mikroskop,IMT-2	Olympus, Hamburg
Kamerasystem Hitachi HV-(20A)	Hitachi
Monovetten (9 ml Volumen) mit EDTA-KE	Sarstedt, Nümbrecht
Paraffiniermaschine	Tissue Tek, SAKURA, Zoeterwoude Niederlande
Petrischalen	Falcon (BD), Heidelberg
pH-Meter pH526	WTW, Weilheim
Photometer GeneQuant RNA/DNA	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pipetten P10, P100, P1000	Eppendorf, Hamburg
Pipetus-Akku	Hirschman-Laborgeräte, Eberstadt
Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach
Reaktionsgefäße 0,5 ml (PCR)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach
Spritze 50ml	BBraun, Melsungen
Spritze 5ml, 10ml, 20ml	Falcon (BD), Heidelberg
Sterilbank HeraSafe	Heraeus (Kendro), Hanau
Sterilfilter 0,2µm Rotrand	Schleicher&Schuell, Dassel
Tischschüttler Rocky	Schultheiss, München
Transwells, 5µm Pore für 24Lochplatte	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
Venofix (grün)	BBraun, Melsungen
Waagen BP 6100, BP 110, BP211 D	Sartorius, Göttingen

Wasserbad	Kottermann, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten 24-, 96-Loch	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
Zentrifuge Rotixa 120 RS	Hettich, Mühlheim/Ruhr

Zellmedien

RPMI 1640 (very low endotoxin)+ stable L- Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 + Glutamax	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY
RPMI 1640 - Glutamax	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY
DMEM + Glucose + Glutamax + Pyruvat	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY
Endothelial cell growth medium MV	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Keratinocytes-SFM medium	Gibco BRL Laboratories, Grand Island, NY

2.3 Zellkultur

2.3.1 Humane dermale microvasculäre Endothelzellen (HDMEC)

Humane dermale microvasculäre Endothelzellen (HDMEC) wurden von Promocell, Heidelberg, gekauft.

Die HDMEC wurden bis Passage 6 in den Versuchen eingesetzt. Zum Kultivieren wurden ca. 300.000 HDMEC in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden bei 80-90% Konfluenz geerntet und entweder in den Versuchen eingesetzt oder passagiert. Alternativ wurden die Zellen für spätere Experimente bei -80°C eingefroren mit 10% DMSO in FCS.

Zur Gewinnung der Überstände wurden die Zellen bis zu 80-90% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, und 48 h weiterkultiviert. Das so gewonnene konditionierte Medium wurde zentrifugiert und als Aliquot bei -20°C eingefroren.

2.3.2 Fibroblasten

IMR-90 Fibroblasten

Material:

Medium:

DMEM

Die Fibroblasten aus dem Zellstamm IMR-90 wurden von Dr. Weßendorf zur Verfügung gestellt. IMR-90 sind Lungen-Fibroblasten, die von einer weiblichen 16 Wochen alten

Kaukasierin stammen. Die Zellen wurden mit einer CPD (eng.: cumulative population doubling = $\text{Log}(\text{Zellzahl nach Passage}) - \text{log}(\text{eingesäte Zellzahl}) / \text{log}(2)$) von 29,35 aufgetaut und mit ca. 2-3 Mio. Zellen pro Petrischale ($\varnothing 10\text{cm}$) in Kultur genommen. Nach 5 h wurden die nicht adhärennten Zellen mit 10 ml frischem Medium abgewaschen. Nach 3 Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt. Um die Zellen in das postmitotische Stadium zu überführen, wurden die IMR-90 regelmäßig geteilt und neu ausgesät. Nach dem Teilen wurden je 1 Mio. Fibroblasten ausgesät und 5 h danach das Medium gewechselt.

Zur Gewinnung des konditionierten Mediums wurden die Zellen nach 5 Tagen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

3T3 Fibroblasten (CCL92 mouse embryo, Rheinwald et Green, 1975)

Medium:

DMEM + Glutamax + Natriumpyruvat + Glucose + Pyridoxin

5 % FCS

1 % Non essential amino acids

1 % Na-Pyruvat

Zur Kultivierung der 3T3 Fibroblasten wurden $2,5 \times 10^6$ 3T3 Zellen in einer 162 cm² Zellkulturflasche ausgesät und bis 80% Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

Die Zellen wurden einmal passagiert, indem sie mit Trypsin-EDTA abgelöst wurden. Dafür wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und 5 ml des Gemisches aus 1/5 vol. Trypsin-EDTA und 4/5 vol. PBS+ 0,02 % EDTA + 0,1 % Glucose zu den Zellen gegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und einmal gewaschen. 1×10^6 3T3 Fibroblasten wurden in einer 162 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden zum Bestrahlen abgelöst und je 7×10^6 Zellen wurden mit 6000rad (⁶⁰CO) behandelt.

Je 3×10^6 Zellen wurden mit 10 % DMSO in FCS eingefroren und in flüssigen Stickstoff bis zum Einsatz gelagert.

2.3.3 Humane primäre Keratinozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten Keratinozyten wurden von Frau Elisabeth Klein zur Verfügung gestellt.

Material:

MEM 25 mM HEPES

Antibiotika-Lösungen:

1. Lösung 500 ml MEM + 20 ml AB/AM + 160 mg Gentamycin
2. Lösung 500 ml MEM + 10 ml AB/AM + 80 mg Gentamycin
3. Lösung 500 ml MEM + 5 ml AB/AM

Trypsin-EDTA

Keratinocytes-SFM Medium mit:

- 2,5 µg EGF (epidermal growth factor)
- 25 mg BPE (bovine pituitary extract)

Trypsin-Inhibitor Lösung

Aufreinigung der Keratinozyten

Für die Aufreinigung von humanen Keratinozyten wurde Haut eingesetzt, die bei plastischen Operationen anfielen. Die Haut wurde in 2,5-3 cm große Stücke geschnitten. Mit einem Dermatom wurde die obere Schicht dünn abgetrennt. Diese Hautstücke wurden in Lösungen mit abnehmenden Antibiotika/Antimykotika (AB/AM) Konzentrationen gewaschen. Die gewaschenen Hautstücke wurden über Nacht bei 4°C in einer 0,25 % Trypsin Lösung inkubiert. Um die Epidermis abzulösen, wurde die Haut in eine Petrischale mit 10 ml Trypsin-EDTA überführt und mit einem Skalpell wurden vorsichtig die Basalzellen abgeschabt. Danach wurden die Epidermisstücke und die Trypsin-EDTA Zellsuspension sorgfältig gevortext, um eine möglichst homogene Einzelzellsuspension zu bekommen. Diese Suspension wurde anschließend durch zwei Lagen Gaze filtriert, und die Gaze mit 13 ml Trypsin Inhibitor Lösung gespült. Die Zellen wurden bei 900 upm, 5 min. zentrifugiert. Das Sediment wurde in Keratinocytes-SFM Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und in FCS mit 10% DMSO eingefroren. Die Zellen wurden für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert.

Kultivierung der Keratinozyten

Medium:

7F- Green Medium:

DMEM/F12 3:1

2mM L-Glutamin

1mM Natriumpyruvat

1x nicht essentielle Aminosäuren

10% FCS

Wachstumsfaktoren:

1,8 x 10⁻⁴ M Adenin Hydrochlorid

10 ng/ml EGF

0,4 µg/ml Hydrocortison

5 µg/ml Insulin

10⁻⁶ M Isoproterenol

5 µg/ml humanes Transferrin

2 x 10⁻⁹ M Triiodothyronin

Das Medium wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Die Kultivierung von primären Keratinozyten wurde nach Methode von Green und Rheinwald durchgeführt.

Zunächst wurden 3 x 10⁶ bestrahlte 3T3 Fibroblasten in einer 162 cm² Zellkulturflasche ausgesät und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 3 x 10⁶ Keratinozyten wurden aufgetaut und zu den 3T3 Zellen in die Kulturflasche gegeben. Das Medium wurde nach 24 h gewechselt und die Zellen für 4-5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei 70% Konfluenz wurden die Keratinozyten geerntet. Dafür wurden zuerst die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Um zuerst die 3T3 Zellen abzulösen, wurde ein Gemisch aus 1/5 vol. Trypsin-EDTA und 4/5 vol. PBS+ 0,02 % EDTA + 0,1% Glucose zu den Zellen gegeben und die Zellen 8 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Diese Lösung bewirkt, dass sich die leichter adhären wachsenden Fibroblasten ablösen und eine nahezu reine Keratinozytenpopulation in der Zellkulturflasche zurückbleibt. Die abgelösten 3T3 Zellen wurden abgesaugt und die verbliebenen Keratinozyten zweimal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Keratinozyten wurde 5 ml Trypsin-EDTA zu den Zellen gegeben und 5-8 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Keratinozyten wurden in vorgewärmten Green 7F-Medium aufgenommen und bei 960 upm zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Green 7F-Medium resuspendiert und gezählt.

Zur Gewinnung von Keratinozyten-konditioniertem Medium wurden 5 x 10⁴ Zellen/ml pro 6-Loch Platte mit 4 ml/Loch ausgesät. Die Zellen wurden 5-6 Tage inkubiert, wobei das Medium alle 2 Tage gewechselt wurde. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und je 4 ml frisches Green 7F-Medium zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurde das Medium abgezogen, zentrifugiert und als Aliquot bei -20°C eingefroren.

2.3.4 CD34DC

Isolierung von CD34 positiven Zellen

Material:

MACS-Puffer

PBS + 2×10^{-3} M EDTA

Preseparationsfilter

CD34-Isolationskit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Das Nabelschnurblut wurde von den Hebammen des Johanniter-Hospitals, Bonn, nach der Entbindung in mit 250 μ l (1.250 i.E.) Natrium-Heparin gefüllten 50 ml Röhren aufgefangen. Das Nabelschnurblut wurde bei 4° C bis spätestens 48 h nach Entnahme gelagert.

Die Aufreinigung von CD34 positiven Stammzellen erfolgte mit dem MACS System. Dieses beruht auf der indirekten Kopplung der aufzureinigenden Zelle an magnetische Partikel. Die Auftrennung erfolgt durch das Anlegen eines Magneten an eine Säule, durch welche die PBMC gespült werden. Zellen, die keine Partikel gebunden haben, werden durch die Säule gespült, wohingegen die gekoppelten Zellen in der Säule zurück bleiben. Durch Entfernen des Magneten werden die so sortierten Zellen eluiert.

Das Protokoll zur Aufreinigung folgt dem von der Herstellerfirma empfohlenen. Zunächst wurde das Nabelschnurblut 1:2 -1:4 mit PBS verdünnt. 25 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig auf 15 ml vorgelegtes Lymphoprep (d= 1,077 g/ml) geschichtet. Lymphoprep ist ein Gemisch aus hochpolymeren Zuckern, deren Dichte so gewählt ist, dass bei Zentrifugation (28 min, 20°C und 2150 upm ohne Bremse) die Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren, während die mononukleären Zellen (PBMC) und die Thrombozyten als Interphase zwischen Plasma und der Lymphoprep-Phase zurückgehalten werden. Die Interphase wurde vorsichtig entnommen und zu 15 ml PBS in einem 50 ml Röhren überführt. Nach Zentrifugation bei 1400 upm und 20°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 25 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Bei diesem Schritt wurden bei der Aufreinigung mehrerer Gradienten die Zellen in einer gesamten Zellsuspension vereinigt. Nach Zentrifugation bei 1000 upm bei 4°C wurden die Zellen in 1 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Je 100 μ l des spezifischen CD34-Antikörpers und 100 μ l humane Antikörper wurden in die Zellsuspension gegeben, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Zellen wurden für 15 min bei 4°C inkubiert und alle 5 min geschüttelt. Zum Waschen der Zellen wurden 25 ml MACS-Puffer hinzugefügt und mit 1000 upm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert und 100 μ l der MicroBeads zu dem Ansatz gegeben. Die Bindung der MicroBeads an den CD34-Antikörper erfolgte während der Inkubation für 15 min bei 4°C und. Alle 5 min

wurden die Zellen durch Schütteln aufgewirbelt. Diesem Schritt folgte ein weiterer Waschschrift mit 25 ml MACS-Puffer und Zentrifugation (4°C, 10 min, 1000 upm). Um mögliche Zellaggregate zu trennen, wurden die Zellen in einem max. Volumen von 4 ml MACS-Puffer durch einen Preseparationsfilter gespült. Aus dieser Zellsuspension wurden im AutoMACS die CD34 positiven Zellen separiert. Die so aufgereinigten Zellen wurden entweder sofort in Kultur genommen oder für spätere Versuche bei -80°C eingefroren.

Kultivierung der CD34 positiven Zellen

Medium:

CD34-Medium (wurde max. 7 Tage bei 4°C aufbewahrt):

RPMI + Glutamax

1% FCS (Gibco)

1% AB/AM

5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol

Das Medium wurde durch ein Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

8×10^4 CD34 positive Zellen wurden mit 300 U/ml GM-CSF, 20 U/ml TNF- α , 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml FLT-3L in 500 µl Medium kultiviert. Nach 4 Tagen wurden 250 µl Medium mit 300 U/ml GM-CSF und 0,5 ng/ml TGF- β 1 zu den Zellen gegeben.

2.3.5 Monozyten

Isolierung von Monozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten wurden unterschiedlich aufgereinigt. Um eine größere Anzahl von Monozyten aus Leukozytenkonzentrat zu separieren, wurde das MACS-System eingesetzt. Für kleinere Monozytenaufreinigungen aus peripherem Blut wurden die Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und erhöhter Osmolarität getrennt. Monozyten besitzen eine leicht geringere Dichte als Lymphozyten, und sie sind zudem noch resistenter gegenüber Veränderungen der Osmolarität. Die Behandlung mit Dextran 500 erhöhte die Dichte der Lymphozyten, wodurch die beiden Zellsorten getrennt werden konnten.

1. MACS-Separation

Material:

MACS-Puffer

PBS + 2×10^{-3} M EDTA

Preseparationsfilter

Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)

Für die Aufreinigung mittels MACS wurde ein Leukozytenkonzentrat aus der Transfusionsmedizin eingesetzt. Die Aufreinigung der PBMCs erfolgte nach dem oben genannten Protokoll (siehe Abschnitt Aufreinigung CD34_{pos} Zellen). Die Separation der Monozyten aus den PBMC erfolgte anders als bei den CD34_{pos} Zellen durch Depletion aller CD14 negativen Zellen.

2. Dichtegradientenzentrifugation

Material:

Nycoprep

Waschpuffer

8 % Dextran-Lösung

In allen anderen Fällen wurden die Monozyten nur durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Zunächst wurde das Blut in mit EDTA versetzten Röhren aus der peripheren Armvene entnommen. Das Blut wurde mit 10% des Volumens mit einer 8% Dextran-Lösung versetzt und für 45 min bei RT inkubiert. Dextran 500 verändert die Dichte der Erythrozyten, wodurch diese sedimentieren und zwei Phasen entstehen. Die obere Phase des Plasmas enthält Monozyten, Lymphozyten und auch Thrombozyten. Im Verhältnis 1:2 wurde das Plasma vorsichtig auf Nycoprep ($d=1,068\text{g/cm}^2$) geschichtet und bei 1750 upm für 20 min bei 20°C und ohne Bremse zentrifugiert.

Die Interphase und die Nycoprep-Phase mit den darin enthaltenen Monozyten wurden vorsichtig abgenommen und mit Waschpuffer für Monozyten dreimal gewaschen (850 upm, 10 min) und anschließend gezählt.

Kultivierung der Monozyten

Monozyten-Medium:

VLE-RPMI-Medium mit

10 % FCS

1 % AB/AM

1×10^6 Monozyten wurden mit 500 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 in Monozyten-Medium in Kultur genommen. Nach zwei Tagen wurden 250 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 zu den Zellen hinzugeben. Nach vier Tagen wurde die Hälfte des Kulturmediums entnommen und durch frisches Medium ersetzt, ergänzt durch 500 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4.

2.3.6 Konstruktion des *in vitro* Hautmodells

Präparation der deepidermisierten Dermis (DED)

Material

Schneidebrett

Steriles Tuch

Akku Dermatome

PBS/VCNT-Lösung

PBS mit 1% AB/AM

Die deepidermisierte Dermis wurde aus Vollhaut von unterschiedlichen Bezugsquellen gewonnen. Zum einen wurde in der Pathologie die Dermis direkt von Leichen abgenommen, zum anderen wurde Vollhaut aus der Frauenklinik verwendet, die bei plastischen Operationen anfiel. Die Vollhaut wurde bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Um die Dermis aus der Vollhaut aufzureinigen, wurde die Vollhaut auf ein steril abgedecktes Schneidebrett gelegt. Von der angetauten Haut wurde die oberste Schicht in ca. 2 cm breite und 0,7 mm dicke Streifen mit dem Akku-Dermatom abgetrennt. Die Streifen wurden über Nacht bei 37°C in der PBS/VCNT-Lösung eingeweicht. Anschließend wurden die Hautstreifen für eine Woche in einer PBS-Lösung mit 1 % AB/AM bei 37°C inkubiert.

Während der darauffolgenden 2-3 Wochen wurde die Haut in PBS inkubiert, wobei das PBS regelmäßig gewechselt wurde. Diese Inkubationszeit führte dazu, dass die Epidermis abstarb und man sie leicht von der Basalmembran ablösen konnte. Diese deepidermisierte Dermis wurde in der Folge 10 x bei -70 °C eingefroren und 10 x bei 37°C aufgetaut. Diese Behandlung sollte sicherstellen, dass alle Hautzellen in der Dermis (Fibroblasten und Endothelzellen) abstarben. Zur späteren Verwendung wurden die Dermisstreifen bei -70°C eingefroren.

Konstruktion der 3-Kompartimenten Haut

Zum Aufbau der 3-Kompartimenten Haut wurde zunächst die 2-Kompartiment-Haut (2-K-Haut) aufgebaut, in dem auf der dermalen Schicht eine epidermale Schicht aufgebracht wurde. Hierfür wurden die in passende Stücke geschnittene DED in eine Petrischale (Ø 5cm) überführt. Auf die oben liegende epidermale Seite wurde ein Edelstahlring mit (Ø 1cm) aufgelegt. Um sicherzustellen, dass die DED intakt war und der Ring Innen- und Außenbereich voneinander trennte, wurde in den Außenbereich des Ringes 4 ml Green 7F-Medium gegeben. Bei einer nicht intakten DED war nach einigen Minuten Flüssigkeit im Innenbereich, diese Häute wurden verworfen. Auf die intakte Dermis wurden in den inneren

Bereich des Ringes 5×10^5 Keratinozyten in 500 μ l Green 7F-Medium gegeben. Nach 24h wurde der Ring entfernt und das Medium erneuert. Das Medium wurde an den folgenden 7 Tagen alle zwei Tage ausgewechselt, wobei das Green 7F-Medium anteilig langsam gegen Green 3F-Medium gewechselt wurde. Anschließend wurde die Dermis mit den angewachsenen Keratinozyten nach oben liegend auf ein gebogenes Gitter überführt. Das Gitter gewährleistete, dass die Keratinozyten Luftsauerstoff ausgesetzt wurden, dabei aber noch über die Dermis mit Nährstoffen versorgt wurde. Der Luftsauerstoff induziert die Differenzierung der Keratinozyten, wobei die basalen Keratinozyten weiterhin proliferieren, wodurch die differenzierten Keratinozyten in Schichten nach außen hochgeschoben werden und immer mehr keratinisieren. Die Inkubation auf dem Gitter dauerte 7 Tage, während dessen alle 2 Tage das Green 3F-Medium ausgewechselt wurde. Dabei wurde sichergestellt, dass die epidermale Schicht nicht befeuchtet wurde.

Um die Endothelzellen, als drittes Kompartiment, auf die 2-Kompartimenten Haut aufzubringen, wurde die 2-Kompartimenten Haut von dem Gitter gelöst und auf die epidermale Seite umgedreht. Um dabei die Keratinozyten so wenig mechanischem Stress wie möglich auszusetzen, wurden zunächst autoklavierte Filter als Puffer in eine Petrischale gelegt, auf die Filter wurden autoklavierte zurechtgeschnittene Dialyse-Schlauchstücke aufgelegt. Auf diese Pufferkonstruktion wurde dann mit der epidermalen Seite nach unten die 2-K-Haut gelegt. Ein Edelstahlring mit (\varnothing 0,75 cm) wurde auf die dermale Seite aufgelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Ring innerhalb des Bereiches lag, in dem die Keratinozyten angewachsen waren. Die Dermis in dem Ring wurde mit $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel™ in je 50 μ l Endothelzell-Medium beschichtet und min. 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden 2×10^5 Endothelzellen auf das Matrigel geschichtet und die Zellen wurden 24 h inkubiert. Um die Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen in die 3-Kompartimenten Haut zu untersuchen, wurde nach den 24h das Endothelzell-Medium in dem Ring abgenommen und ca. 1×10^6 Langerhans Vorläuferzellen (Monozyten oder CD34DC) in frischem CD34-Medium in den Ring überführt. Nach 24-48h wurden die 3-K-Häute in Paraformaldehyd (10%) fixiert und in Paraffin eingebettet.

2.4 Funktionelle Analysen

Transwell-Migration Test

Material:

Transwells (Corning Costar $5\mu\text{m}$ Porengröße)

Matrigel™ (GFR, BD Pharmingen)

HDMEC (Promocell)

Um die Migration der Langerhans Vorläuferzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde das Zwei-Kammer-System von Corning Costar gewählt. Die beiden Kammern werden dabei durch eine Membran mit einer Porengröße von 5µm Durchmesser getrennt. In die untere Kammer wurden 300 µl des Faktors gegeben, der auf chemoattraktive Wirkung untersucht werden sollte. In die obere Kammer wurden ca. 1×10^6 Zellen in 100µl Kulturmedium pipettiert. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die obere Kammer abgehoben, und die in die untere Kammer migrierten Zellen mit der Neubauer Zellzählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Um den Einfluss der Endothelzellen bei der Immigration in die Dermis der Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde die Membran zusätzlich mit Matrigel™ und mit dermalen HDMEC beschichtet (Abb.2.1). Zunächst wurden 50µg/cm² Matrigel™, ein Äquivalent der extrazellulären Matrix, in 50µl Endothelzell-Medium auf die Membran aufgetragen und 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 4×10^4 HDMEC in ca. 100µl Endothelzell-Medium auf das Matrigel geschichtet. Diese Zellkonzentration bildete nach ca. 20h einen konfluenten Zellrasen auf dem Matrigel™, was in vorherigen Versuchen ausgetestet wurde. Um die HDMEC vor Austrocknung während der Inkubation zu schützen, wurde in die untere Transwell-Kammer 300µl Endothelzell-Medium gegeben. Nach 20h wurde in der oberen Kammer das Endothelzell-Medium entfernt, und das Transwell in ein neues Loch gehängt. Für die transendotheliale Migration wurden 1×10^6 Vorläuferzellen in 100µl in die obere Kammer gegeben, in der unteren Kammer wurde das Testmedium in einem Probenvolumen von 300µl eingesetzt.

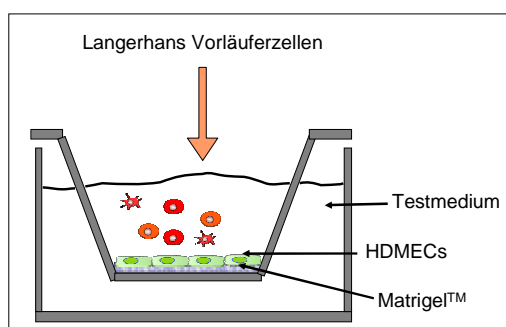


Abb.2.1. Aufbau des Transwell-Migrations Tests

Für den Transwell-Migrations Test wurde das zwei-Kammersystem von Corning eingesetzt. Um transendotheliale Migration untersuchen zu können, wurde die Membran, die die obere und untere Kammer trennt, mit Matrigel™ und HDMECs beschichtet.

Adhäsions-Test

Die Adhäsions-Tests wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Aumailley in Köln am Institut für Biochemie durchgeführt, von der alle in diesen Versuchen eingesetzten Chemikalien zu Verfügung gestellt wurden.

Die Adhäsion von MoDC und CD34DC an Proteine der extrazellulären Matrix wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte untersucht. Als erstes wurden die Löcher über Nacht bei 4°C mit Laminin 111 (20 µg/ml), Laminin 332 (20 µg/ml), Collagen I (40 µg/ml), Collagen IV (4 µg/ml) und Fibronectin (40 µg/ml) beschichtet. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung der Zellen, wurden 1% BSA eingesetzt und für 2h bei 37°C inkubiert. Jeweils 9×10^4 Zellen in 100µl Serumfreiem Medium wurden in die Löcher gegeben und bei 37°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurden nicht adhärierte Zellen und das Medium verworfen und die adhärierten Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1% Glutaraldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und mit 0,1% Crystallviolett für 25 min. angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch stringentes Waschen entfernt, bevor 0,2% Triton X-100 pro Loch zu den Zellen gegeben wurden und die optische Dichte der Löcher bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen wurde. Die adhärierten Zellen wurden zusätzlich unter einem Phasenkontrastmikroskop mit einer Digitalkamera fotografiert. In parallel angesetzten Platten wurden die adhärenen Zellen mit 70% Methanol für 5 min. bei -20°C fixiert. Diese Platten wurden für 10 min. an der Luft getrocknet und bei -70°C für anschließende immunhistochemische Analysen gelagert.

2.5 Immunologische Nachweismethoden

Immunhistologie

Material:

Tris-Puffer

LSAB2-System (DAKO, Hamburg, Germany)

Kaiser's Glyceringelatine

Um Zellen oder Hautschnitte zu färben, wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Reaktion (APAAP)-Methode mit dem LSAB-Kit angewandt.

Dafür wurden die adhärierten Zellen bzw. Schnitte zunächst mit Tris-Puffer angefeuchtet. 10 µg/ml spezifischer Antikörper oder unspezifischer Antikörper mit entsprechendem Isotyp als Kontrolle wurden auf die Zellen bzw. die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 1h inkubiert. Der Antikörper wurde mit Tris-Puffer abgewaschen, danach wurden die Zellen/Schnitte 30 min mit dem Brücken-Antikörper aus dem LSAB-Kit inkubiert und anschließend mit Tris-Puffer gewaschen. Während der darauf folgenden 10 min Inkubation band der lösliche Komplex aus alkalischer Phosphatase und monoklonalen anti-alkalische-Phosphatase-Antikörpern an den Brücken-Antikörper. Das Substrat Fuchsin-

Chromogen wurde direkt vor Einsatz mit dem Activating Agent und dem spezifischem Puffer angemischt und auf die Präparate gegeben.

Während der Reaktion der Phosphatase mit dem Farbsubstrat wurden die Präparate beobachtet und nach ca. 8-10 min die Reaktion mit Wasser gestoppt. In den Hautschnitten wurden teilweise durch anschließende Färbung mit Hämatoxylin/Eosin die Zellkerne und das Zytoplasma zur besseren Abgrenzung blau dargestellt. Die Zellen/Schnitte wurden mit Kaiser's Glyceringelatine und Deckgläschen dauerhaft eingedeckt.

ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay)

Material:

Nunc MaxiSorb 96-Lochplatten

TMB-Lösung (BioSource, Solingen)

1,8 N H₂SO₄-Lösung

0,05% TWEEN-20 in PBS

Human TGF-β1 CytoSet (BioSource, Solingen)

Human GM-CSF CytoSet (BioSource, Solingen)

Der ELISA ist eine Nachweismethode, die auf der Kombination einer klassischen Antigen-Antikörper Reaktion und einer spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion beruht. Als Enzym wurde die Meerrettich-Peroxidase (engl. *Horse-Radish Peroxidase* HRP) eingesetzt, die das Substrat TMB (Tetra-Methyl-Benzidin) umsetzt. Die Stärke des Umsatzes wurde nach Abstoppen der Reaktion mit 17% H₂SO₄ im Photometer bestimmt. Die quantitative Bestimmung mittels ELISA erfolgte anhand der Messung einer Standardkurve des verdünnten Proteins.

In der Arbeit wurde eine abgewandelte Form des ELISA durchgeführt, der sogenannte Sandwich- oder capture-ELISA. Hierbei lassen sich sezernierte Produkte wie Cytokine nachweisen. Im Gegensatz zu dem ursprünglichen ELISA werden keine Antigene an die Trägeroberfläche gebunden, sondern Antigen-spezifische Antikörper. Diese binden hochaffin und in sehr niedrigen Konzentrationen das Antigen. Mit einem zweiten Antikörper, der spezifisch ein anderes Epitop auf dem Antigen erkennt, erfolgt der Nachweis. Der zweite Antikörper ist über das Biotin-Streptavidin System an die Peroxidase gekoppelt.

Im Test wurde mit 50 µl/Loch eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Die Konzentrationen der Antikörper entsprachen jeweils den Vorgaben des Herstellers. Die Antikörper wurden in 1x PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Platten gekoppelt. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer mit einem ELISA-Washer gewaschen. Nach jedem Waschen wurden die Platten gründlich auf Papiertüchern

ausgeklopft, um mögliche Pufferreste zu entfernen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden 250 µl Blockierpuffer (1% BSA in 1x PBS) eingesetzt und die Platten bei Raumtemperatur 2h inkubiert. Danach folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Jeweils 50 µl der konditionierten Medien wurden unverdünnt auf die Platten aufgetragen. Zur Bestimmung einer möglichen unspezifischen Bindung der Antikörper wurden 50 µl Endothelzell-Medium eingesetzt. Zur Bestimmung der Standardkurve wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Zytokins (Teil des Nachweis-Kits) aufgetragen. In alle Löcher wurden noch 50 µl des Detektions-Antikörpers (biotinyliert) in entsprechender Konzentration pipettiert. Dieser Ansatz wurde schüttelnd bei Raumtemperatur 2h inkubiert. Nach dem folgenden dreimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden 50 µl der Streptavidin-HRP Lösung aufgetragen und die Platten 45 min. abgedeckt bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Platten fünfmal gewaschen und jeweils 50 µl TMB in die Löcher pipettiert. Die Platten wurden 15-30 min entwickelt, bis die Reaktion mit 50 µl 15% H₂SO₄ abgestoppt wurde. Bei der Enzymreaktion wird das farblose TMB in einen blauen Farbstoff umgewandelt, der durch die Schwefelsäure ins Gelbe umschlägt. Die Absorption dieses Farbstoffes wurde mit dem Photometer gemessen, mit einem Testfilter ($\lambda=490$ nm) und einem Referenzfilter von ($\lambda=630$ nm).

Das Computerprogramm (KC Junior, Bio-Tek Instruments) zieht automatisch die Absorptionswerte der Hintergrundwerte von den Messwerten der beschichteten Löcher ab und setzt diese in das Verhältnis zu der Standardkurve.

Chemokin-Array

Der Chemokin-Array Test der Firma RayBiotech (Norcross, GA, USA) beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion und einer spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion. Auf einer Membran wurden von der Firma RayBiotech spezifische Antikörper gegen 38 Chemokine aufgebracht. Das Procedere des Tests folgte dem von der Firma mitgeliefertem Protokoll. Die Membran wurde mit den zu untersuchenden konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Membran dreimal mit den mitgelieferten Waschpuffern gewaschen wurde, wurde der zweite Antikörper dazugegeben. Der zweite Antikörper ist über das Biotin-Streptavidin System an die Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse-Radish Peroxidase HRP) gekoppelt. Die HRP-Peroxidase setzt das mitgelieferte Substrat um, wobei Licht freigesetzt wird (Chemolumineszenz). Durch das Auflegen eines Röntgenfilms wurde nur an den Stellen der Röntgenfilm geschwärzt, an denen spezifisch ein Chemokin gebunden wurde. Der entwickelte

Röntgenfilm wurde mittels eines Auflichtscanners eingescannt und die Stärke der Schwärzung densitometrisch mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet.

Ein positives Signal wurde so definiert, dass der spezifische Schwärzungswert zweimal stärker als der Wert der Negativkontrolle sein musste.

Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können nicht nur Lymphozyten, sondern prinzipiell alle Partikel im Größenbereich von 0,5 µm (z.B. Bakterien) bis zu etwa 100 µm (große eukaryotische Zellen) multiparametrisch vermessen werden, vorausgesetzt, dass sich die Zellen oder Partikel in Suspension befinden. Das Durchflusszytometer besteht aus drei Komponenten, dem Flusssystem, dem Optischen System und dem Detektionssystem.

In dem Flusssystem wird die Einzelzellsuspension durch die Zytometernadel aufgenommen; durch die trichterartige Verengung erfolgt eine Beschleunigung (hydrodynamische Fokussierung), wodurch die Zellen perlschnurartig aufgereiht werden und so in die Messküvette gelangen, wo sie einzeln von einem Laserstrahl erfasst werden. Mit entsprechenden Photodetektoren können die Zellen dann analysiert werden. Anhand des Vorwärtsstreulichts (FSC) kann die Größe des Partikels bestimmt werden, das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird als Maß für die Granularität (Granula, Membranen) der Partikel eingesetzt.

In allen Analysen wurde 1 µg/ml 7AAD (7-Aminoactinomycin D) als Lebend/Tod-Farbstoff eingesetzt, da 7AAD an DNA-Fragmente bindet und so tote Zellen in der Zellsuspension detektiert werden können. Um die Zellen zu charakterisieren, wurden Antikörper gekoppelt an die Fluoreszenzfarbstoffe PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und APC (Allophycocyanin) eingesetzt. Eine Liste der verwendeten Antikörper befindet sich im Anhang Tabelle VII.

Die Zellen wurden auf ca. 5×10^4 Zellen/ 100µl in FACS-Puffer eingestellt und jeweils 5µl des ungekoppelten Maus-Antikörpers (Endkonzentration 2,5 µg/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 4°C 30 min. inkubiert und danach mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen bei 1300 upm und 4°C, der Überstand wurde verworfen. Im Falle der eingesetzten ungekoppelten Ratten-Antikörper folgte für 25 min. die Inkubation mit einem monoklonalen Maus anti-Ratte-Antikörper, durch den alle Ratten-Fc-Teile von Maus-Immunglobulinen gebunden wurden. Dieser Schritt war erforderlich, da als farbstoffkonjugierter Sekundärantikörper ein FITC-konjugierter polyklonaler F(ab)2 Ziege anti-Maus-Antikörper eingesetzt wurde. Nach dem Abwaschen des monoklonalen Maus anti-Ratte-Antikörpers bei 4°C und 1300 upm wurde 2,5 µg/ml Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben und die Zellen bei 4°C für 25

min. inkubiert. Nach dem Waschen wurden zur Blockierung möglicher freier Bindungsstellen 2,5 µl Mausserum zu den Zellen gegeben und die Zellen bei 4°C für 25 min. inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Zugabe der direkt gekoppelten Antikörper CD1a-RD1 und CD14-APC und des Lebend/Tot-Farbstoffes 7-AAD. Nach der Inkubation für 20 min. bei 4°C wurden die Zellen bei 4°C und 1300 upm gewaschen. In parallelen Ansätzen wurden Kontrollfärbungen mit unspezifischen Antikörpern gleichen Isotypes durchgeführt.

Für die **Sortierung der CD34DC** entsprechend ihrer Expression von CD1a und CD14 wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und in max. 300 µl Gesamt-Volumen mit den CD1a-RD1 und CD14-APC gekoppelten Antikörpern gefärbt. Auf die Färbung von toten Zellen wurde hierbei verzichtet. Die CD34DC wurden auf max. 5×10^6 Zellen/ml mit FACS-Puffer nach dem Waschen eingestellt. Um bei der Sortierung die Einzelzellsuspension zu garantieren, wurden die CD34DC durch Pipettieren durch eine Membran separiert. Die Sortierung erfolgte gekühlt und semisteril.

Durchflusszytometrische Analyse

Die Auswertung der Daten der eingemessenen Zellen erfolgte mit dem FACSDiva-Programm (BD, Heidelberg). Zunächst wurden die Zellpopulationen in einem physikalischen Punktdiagramm (FSC gegen SSC) eingegrenzt. Von der eingegrenzten Population wurden durch die Analyse der 7-AAD Färbung die toten Zellen abgezogen. Alle lebenden Zellen wurden dann in einem Punktdiagramm aufgetragen, in dem die PE-Fluoreszenz (CD1a) gegen die APC-Fluoreszenz (CD14) aufgetragen wurde. Mit Hilfe von Kontroll-Antikörpern gleichen Isotypes wurde ein Quadrant gesetzt, der die einzelnen Populationen hinsichtlich ihrer CD1a/CD14 Expression trennte. Jede Population wurde auf die prozentuale Verteilung und die Intensität der FITC-Färbung in einem Histogramm untersucht. Die Intensität einer Fluoreszenzfärbung wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) definiert. Um in die Analyse eine mögliche unspezifische Bindung des Antikörpers einzubeziehen, wurde der relative Fluoreszenzindex (rFI) berechnet:

$$rFI = (MFI_{\text{spezifische Färbung}} - MFI_{\text{Kontrollfärbung}}) / MFI_{\text{Kontrollfärbung}}$$

2.6 Molekularbiologische Methoden

PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Gen-Expression der Integrine und der Chemokinrezeptoren auf mRNA-Ebene semiquantitativ nachgewiesen. Nach Isolierung der mRNA wurde diese

durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann mit spezifischen Oligonukleotiden die jeweiligen cDNA Abschnitte durch normale PCR analysiert.

RNA-Isolierung

Die Präparation der RNA erfolgte mit TRIzol[®], einer Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, nach dem Protokoll des Herstellers. Diese Methode erlaubt die Auftrennung von RNA (wässrige Phase), DNA (Interphase) und Proteinen (organische Phase).

Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml TRIzol[®] bei Raumtemperatur für 5 min. lysiert. Diese Lysate konnten bis zur Aufreinigung der RNA bei -70°C gelagert werden. Durch Zugabe von 200µl Chloroform und 15 sec. starkem Schütteln gefolgt von 15 min. Zentrifugation bei 4°C und 13 000 upm erfolgte die Trennung in eine wässrige und eine organische Phase. Zur Fällung der RNA wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 µl RNasefreies Glycogen und 0,5 µl Isopropanol dazugegeben. Die RNA Präzipitation erfolgte bei -70°C über Nacht. Nach dem Auftauen wurde die RNA durch Zentrifugation bei 13 000 upm, 4°C, 15 min. als Sediment gewonnen. Die so aufgereinigte RNA wurde mit 75% Ethanol und durch Zentrifugation bei 13 000 upm, 4 Grad, 15 min. gewaschen. Zur Trocknung der RNA wurden die Reaktionsgefäße über Kopf stehen gelassen oder bei sehr geringen RNA Konzentrationen mit der Speedvac-Zentrifuge lyophilisiert. Die RNA wurde in 50-100 µl sterilem RNase-freiem Wasser während 10 min Inkubation bei 56°C aufgelöst. Die RNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Bei optimaler Präparation war das Verhältnis $\lambda_{260/280}$ ca. 1,8 (1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml RNA).

RT-PCR

Bei der Gewinnung der cDNA wird die RNA mittels der reversen Transkriptase, einem Enzym, das von Retroviren zur Einbringung ihres Erbgutes in die Wirts-DNA verwendet wird, umgeschrieben. In den hier beschriebenen Reaktionen wurde die Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) reverse Transkriptase eingesetzt. Die PCR beschreibt einen Prozess, in dem die spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten bis zur Nachweisgrenze stattfindet und zwar durch verschiedene Schritte eines sich wiederholenden Zykluses. Alle Schritte sind temperaturabhängig. Während des ersten Schrittes erfolgte die Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei 94°C. Das Anlagern der spezifischen Oligonukleotide an die Einzelstränge erfolgte bei 55°C. Bei einem Aktivitätsmaximum von 72°C fand die Elongation des komplementären DNA-Stranges durch die temperaturabhängige *Thermophilus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase statt.

Durch unterschiedliche Anzahl von Zyklen und entsprechenden Mengen von cDNA wurden so DNA-Abschnitte amplifiziert, die durch Anfärben mit Ethidium-Bromid in einem 1% Agarosegel hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt und visualisiert werden können. Um die spezifische Gen-Expression semiquantitativ auszuwerten und zur Kontrolle der durchgeführten PCR wurde die Amplifizierung des konstitutiv exprimierten Genes β -Actin durchgeführt.

Transkription der RNA in cDNA

Für die Durchführung der reversen Transkription wurden zunächst 1 μ g RNA in 15,5 μ l H₂O für 3 min bei 65°C erhitzt und dann direkt auf Eis gestellt. Ebenfalls auf Eis gekühlt wurde dann der RT-Reaktions-Mix hergestellt. Pro RNA-Aufreinigung wurde folgender Mix mit einem Gesamt-Volumen von 34,5 μ l hergestellt:

RNasin	0,5 μ l
Random primers 60 ng/ μ l	2,0 μ l
1,25 mM dNTP	16 μ l
5x RT-Puffer	10 μ l
0,1 M DTT	5 μ l
MoMLV-RT	1 μ l

Zu den 15,5 μ l RNA wurden jeweils 34,5 μ l Reaktion-Mix hinzugegeben, die RT-Reaktion erfolgte während der Inkubation bei 37°C für 1h. Die Denaturierung der cDNA wurde durch 3 min. Inkubation bei 95°C erreicht, gefolgt von Schockkühlen auf 4°C durch Überführen auf Eis. Die cDNA wurde mit 500 μ l sterilem Wasser verdünnt und wurde bei -20°C aufbewahrt.

Spezifische PCR

Die optimale Zahl der PCR-Zyklen hinsichtlich der quantitativen Aussagekraft der Banden wurde in Vorversuchen mit β -Actin-spezifischen Oligonukleotiden (Primer) bestimmt, wie auch jeweils die optimale Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) für die proteinspezifischen Oligonukleotide.

Für die PCR wurde zunächst ein PCR-Mix hergestellt:

PCR-Mix:

H ₂ O	29,25 μ l (für 5 μ l cDNA; 24,25 μ l für 10 μ l cDNA; 14,25 μ l für 20 μ l cDNA)
------------------	--

10 x Puffer	5 µl
50 mM MgCl	1,5 µl (Endkonz. 1,5 mM)
1,25 mM dNTP	8 µl (Endkonz. 0,2 mM)
Taq	0,25 µl (Endkonz. 1,25 U/Reaktion)
Sense Primer	0,5 µl (Endkonz. 20 pMol/Reaktion)
Antisense Primer	0,5 µl (Endkonz. 20 pMol/Reaktion)
Gesamtvolumen	45 µl

Jeweils 45 µl des PCR-Mixes wurden pro Reaktion in ein Reaktionsgefäß pipettiert, das auf Eis gelagert wurde. 5 µl cDNA wurden dazugegeben, wodurch das Endvolumen 50 µl betrug. Die Reaktionsgefäße wurden in die PCR-Maschine gesetzt, in der die Reaktion automatisch gesteuert wurde. Die Liste der spezifischen Primer und Zyklenzahlen, wie auch der entsprechenden Annealing-Temperatur sind im Anhang aufgelistet (siehe Tabelle VIII im Anhang).

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Visualisierung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde 1% Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde 1 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml) dazugegeben. Jeweils 15 µl des Amplifikates wurden mit 5 µl Gel-Ladepuffer (6fach konzentriert) in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V und ca. 20 min. Parallel wurde ein 1 kbp-Marker (Invitrogen, Karlsruhe) zur Bestimmung der aufgetrennten Fragmentgrößen im Gel eingesetzt. Die erhaltenen Banden wurden unter UV-Belichtung (254 nm) visualisiert und mit einem Bildwandlersystem digital gespeichert (Eagle Eye II-System). Die densitometrische Auswertung der Bandenstärke erfolgte mit der WinCam2.2 Software (Cybertech, Berlin, Deutschland).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotyp der Langerhans Vorläuferzellen im Blut

Um aus dem Blut in ein Gewebe einzuwandern, benötigen Zellen eine Ausstattung mit bestimmten Molekülen, unter anderem Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren. Um die Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen in die Haut zu untersuchen, wurde der Phänotyp der beiden verschiedenen Vorläuferzellarten analysiert. Es wurde die Expression von Chemokinrezeptoren und verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Monozyten, auf von Monozyten abstammenden DC (MoDC) und auf aus Stammzellen generierten DC (CD34DC) mit FACS-Analyse und mit RT-PCR bestimmt.

3.1.1 Monozyten als DC Vorläuferzellen

Frisch isolierte Monozyten konnten aufgrund der Stärke der Expression von CD14 in eine CD14_{low} und eine CD14_{high} Subpopulation unterteilt werden (Abb.3.1.1). Der prozentuale Anteil der CD14_{high} Monozyten war deutlich höher als der CD14_{low} Zellen, insgesamt waren spenderabhängig 3-7% der Monozyten CD14_{low} Zellen.

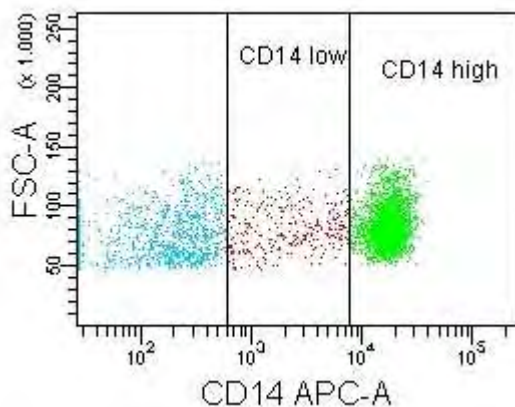


Abb.3.1.1 Expression von CD14 auf Monozyten

Monozyten wurden aus dem peripheren Blut isoliert, mit einem monoklonalen CD14-spezifischen APC gekoppelten Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Punktdiagramm eines Spenders mit CD14_{low} Zellen (rote Wolke) und CD14_{high} Zellen (grüne Wolke), wobei in alle Analysen nur lebende Monozyten, die nach 7-AAD Färbung negativ waren, einbezogen wurden.

Die zwei Subpopulationen unterschieden sich auch in der Expression des niedrig-affinen IgG Rezeptors (CD16, FcγRIII). Beide waren CD16 positiv, allerdings war die Expression von CD16 auf CD14_{low} Zellen sehr viel höher (rFI = 157,7 auf CD14_{low} und 16,4 auf CD14_{high}) (Abb.3.1.2). Der relative Fluoreszenz-Index (rFI) spiegelt das Verhältnis der spezifischen

Bindung des Antikörpers zu der unspezifischen Bindung eines äquivalenten irrelevanten Antikörpers mit passendem Isotyp dar.

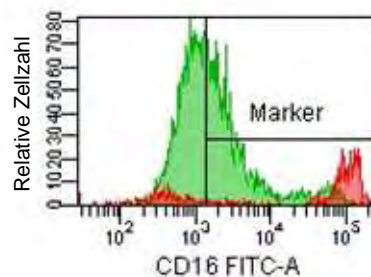


Abb.3.1.2 Expression von CD16 auf Monozyten

Monozyten wurden mit spezifischen monoklonalen CD16, CD14-APC und CD1a-PE Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der CD16 Antikörper wurde mit einem sekundären Antikörper indirekt an FITC gekoppelt. Aufgetragen ist die relative Zellzahl über der Fluoreszenz-Intensität der CD16 Färbung; alle lebenden CD14-positiven Monozyten wurden analysiert. CD14_{low} Zellen (rote Kurve) exprimierten CD16 stärker als CD14_{high} Zellen (grüne Kurve). Der Marker wurde aufgrund der Bindung eines irrelevanten Antikörpers mit gleichem Isotypen gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n=5.

Chemokinrezeptoren auf Monozyten

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen sowohl während des normalen ruhenden als auch im aktivierten Zustand der Haut eine essentielle Rolle bei der Migration von Leukozyten. Durch Chemokine wird die Immigration von Leukozyten in die verschiedenen Gewebe gelenkt und sie regulieren auch die Migration der DC in die drainierenden Lymphknoten. Es wurde aus der großen Vielzahl von Chemokinrezeptoren nur die Expression solcher Rezeptoren untersucht, deren Liganden bei der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Haut eine Rolle spielen könnten.

CCR1, ein Rezeptor für u. a. MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β , wurde stärker auf der CD14_{high} Population exprimiert (rFI = 4,5 auf CD14_{high} und 0,3 auf CD14_{low}) (Abb.3.1.3). CCR2, ein Rezeptor für MCP-1, wurde ebenfalls stärker auf der CD14_{high} Population exprimiert. CX₃CR1, der Rezeptor für Fractalkine, wurde dagegen stärker von der CD14_{low} Population exprimiert. CCR6, der Rezeptor für MIP-3 α , war nur auf den CD14_{low} Zellen exprimiert. Allerdings war die Expression von CCR6 sehr gering, und in der RT-PCR konnte es nicht in Monozyten nachgewiesen werden (Abb.3.1.7).

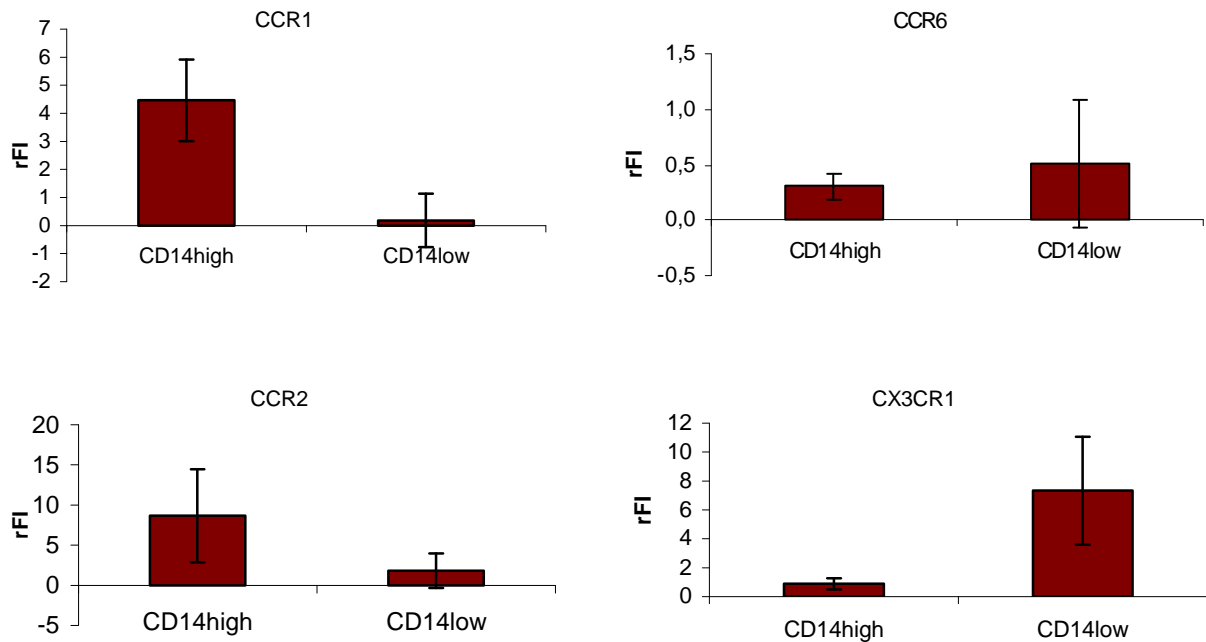


Abb. 3.1.3 Expression der Chemokinrezeptoren auf Monozyten

Monozyten wurden nach Isolierung mit spezifischen Antikörpern gegen diverse Chemokinrezeptoren, die indirekt an FITC gekoppelt waren, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In die Analyse wurden alle lebenden CD14-positiven Zellen einbezogen, wobei die Fluoreszenz-Intensität der Rezeptorfärbung auf den CD14^{high} und CD14^{low} Zellen getrennt ermittelt wurde. Dargestellt ist der rFI beider Populationen, als Mittelwerte von n=4 (+/-SD).

Neben den dargestellten Chemokinrezeptoren wurde auch die Expression von CCR3, CCR8 und CCR10 untersucht. Es konnte auf den Monozyten kein CCR8 und CCR10 nachgewiesen werden.

CCR3 wurde sehr heterogen von den einzelnen Spendern der Monozyten exprimiert (nicht gezeigt). Tendenziell exprimierten die CD14^{high} Zellen CCR3 stärker als die CD14^{low} Zellen. Von den CD14^{high} Zellen waren ca. 25-70% CCR3-positiv, wobei 0-25% der CD14^{low} Zellen CCR3 exprimierten.

Das Ergebnis der Chemokinrezeptor-Analyse auf den Monozyten zeigte, dass die CD14^{high} Zellen die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR3 stärker als die CD14^{low} Zellen exprimierten. CD14^{low} Monozyten exprimierten dagegen CX₃CR1 und CCR6 stärker, dies könnte einen Hinweis auf die spätere Effektorfunktion der jeweiligen Zellen geben.

Expression von Integrinen auf Monozyten

Die Monozyten wurden weiterhin auf die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Klasse der Integrine, die eine wesentliche Rolle bei der

Adhäsion an Epithelzellen und bei der Immigration in die Gewebe von Leukozyten spielen (Mazzone and Ricevuti, 1995).

Die β -Integrine CD18 und CD29 wurden von beiden Monozytenpopulationen exprimiert, allerdings wurde CD18 deutlich stärker exprimiert als CD29 (Abb.3.1.8). Die α -Integrine CD11a, CD11c, CD49b und CD49f wurden von allen Monozyten gleichmäßig exprimiert (nicht gezeigt). Alle Monozyten waren CD11b positiv (100%), allerdings trugen CD14_{low} Zellen deutlich weniger CD11b Moleküle auf der Oberfläche, als CD14_{high} Zellen (Abb. 3.1.4). CD49c konnte auf Monozyten nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

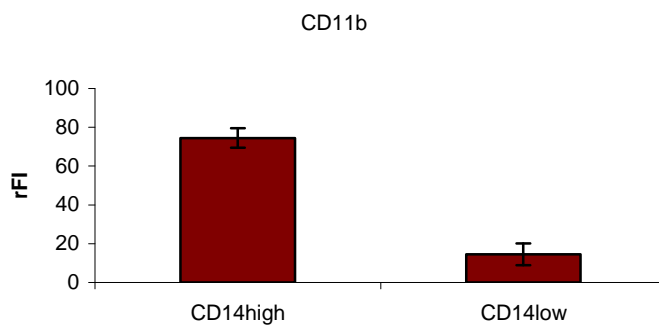


Abb.3.1.4 Expression von CD11b auf Monozyten

Monozyten wurden nach Isolierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD11b und CD14 gefärbt. Der CD11b Antikörper wurde indirekt an FITC gekoppelt, der CD14 Antikörper war direkt an APC gekoppelt. Die Monozyten wurden nach der Färbung durchflusszytometrisch analysiert. In die Analyse wurden alle lebenden CD14-positiven Zellen einbezogen, wobei die Fluoreszenz-Intensität der CD11b Färbung auf den CD14_{high} und CD14_{low} Monozyten getrennt ermittelt wurde. Dargestellt ist der rFI der beiden Populationen als Mittelwerte von n=4 (+/-SD).

Als weiteres Adhäsionsmolekül wurde die Expression von CD31 (PECAM-1) analysiert. Dabei konnten keine Unterschiede in der Intensität der Expression beobachtet werden; alle Monozyten exprimierten CD31 (nicht gezeigt).

Insgesamt konnten bei der Expression der Adhäsionsmoleküle wenige Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen beobachtet werden, was bedeutet, dass beide Subpopulationen gleichermaßen in der Lage sind, an Epithelien zu adhären oder in Gewebe zu immigrieren.

3.1.2 Aus Monozyten generierte DC (MoDC)

Um DC zu generieren, wurden die aufgereinigten Monozyten mit GM-CSF und IL-4 in Medium mit sehr niedrigem Endotoxin-Gehalt in Kultur genommen (siehe Abschnitt 2.3.5). Nach drei und sechs Tagen Kultivierung wurde der Phänotyp der Zellen hinsichtlich der Expression von CD1a und CD14 untersucht. CD1a wurde als Marker für differenzierte DC definiert und CD14 als monozytärer Marker.

Ein großer Teil der Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 in Kultur genommen wurden, begannen nach drei Tagen CD1a zu exprimieren (Abb.3.1.5). Insgesamt konnte zwischen drei Subpopulationen unterschieden werden, die CD14⁺CD1a⁻ Zellen (im Folgendem CD14_{pos} Zellen genannt), die CD14⁺CD1a⁺ Zellen (im Folgendem doppelpositive Zellen (DP Zellen) genannt) und die CD14⁻CD1a⁺ Zellen (im Folgendem CD1a_{pos} Zellen genannt).

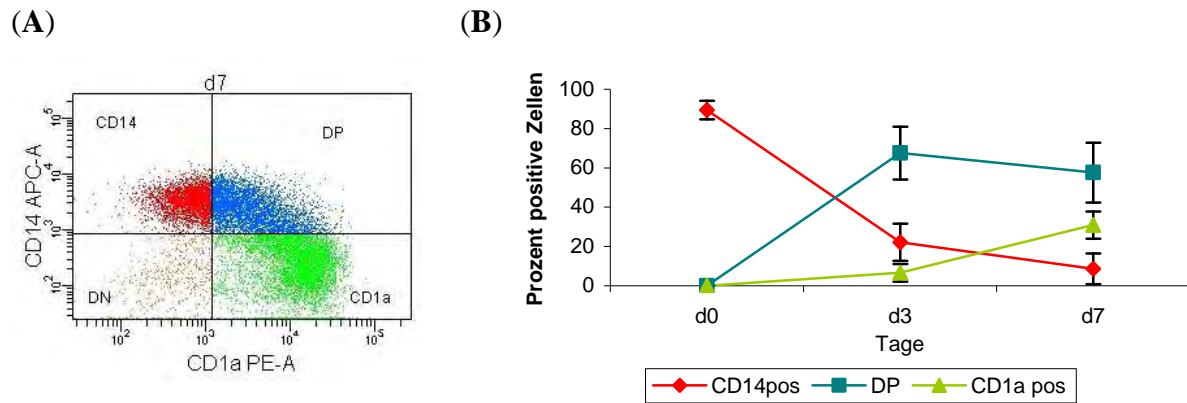


Abb.3.1.5 Differenzierung der Monozyten zu DC

Monozyten wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF sieben Tage kultiviert. An d0, d3 und d7 wurden sie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a doppelt gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte durch die Quadrantenanalyse (A), in der ein Quadrant entsprechend der Färbung der passenden Kontrollantikörper mit gleichem Isotyp gesetzt wurde. Dargestellt in (B) ist die prozentuale Verteilung von CD1a und CD14 exprimierenden Zellen als Mittelwert von n=5 (+/-SD).

Nach sieben Tagen Kultivierung waren nur noch wenige CD14_{pos} Zellen vorhanden (8,6%), 57,6% der Zellen exprimierten sowohl CD14 und CD1a, 30,9% der Zellen waren CD14-negativ und CD1a-positiv (Abb.3.1.5).

Durch die Kultivierungsbedingungen war der größte Anteil der Monozyten zu MoDC differenziert, wobei die DP Zellen möglicherweise noch nicht endgültig differenzierten DC entsprechen.

Expression von Chemokinrezeptoren auf MoDC

MoDC unterschieden sich nicht nur in der Expression von CD14 und CD1a von den Monozyten, sondern auch in der Expression der Chemokinrezeptoren. Nach der Differenzierung zu MoDC wurden die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CX₃CR1 nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert (Abb.3.1.6). Mit zunehmender Differenzierung zu MoDC regulierten die Zellen die Expression von CCR6 auf der Oberfläche hoch (Abb.3.1.6).

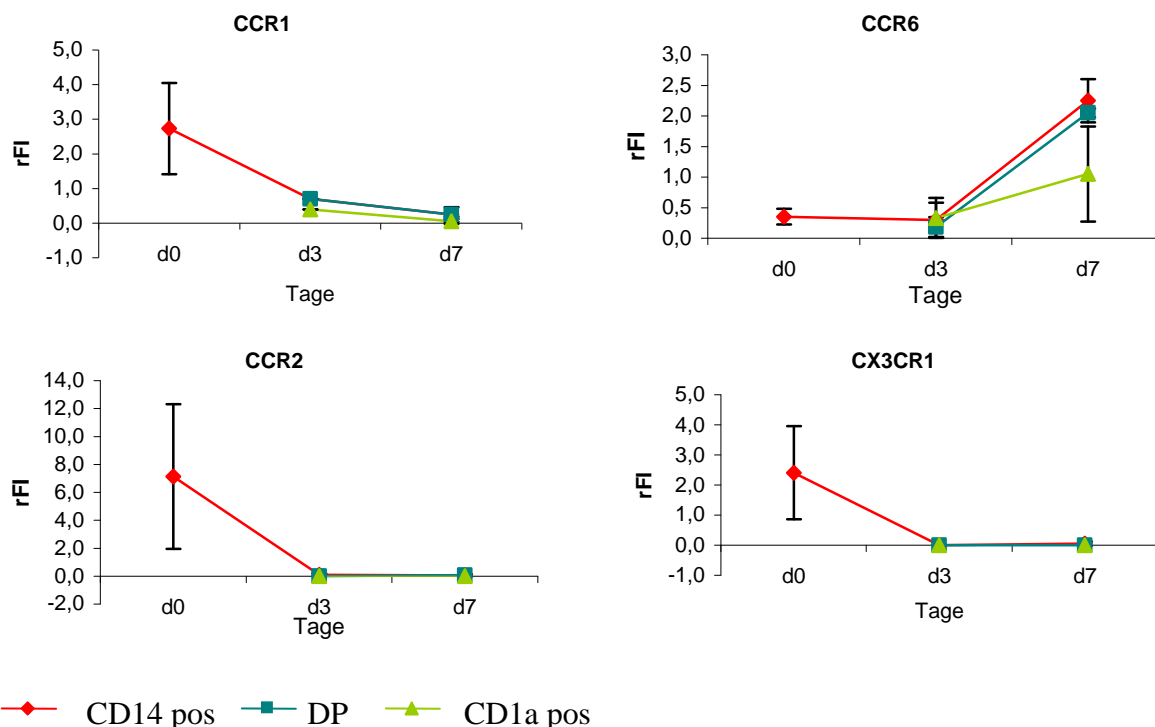


Abb.3.1.6 Expression der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche von Monozyten und MoDC

Monozyten wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF sieben Tage kultiviert. An d0, d3 und d7 wurden sie mit monoklonalen Antikörpern gegen die Chemokinrezeptoren, die indirekt an FITC gekoppelt wurden, und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der rFI der FITC-Fluoreszenz auf den Subpopulationen der MoDC an den unterschiedlichen Zeitpunkten als Mittelwert von n=5 (+/-SD).

Um die Ergebnisse der FACS-Analyse zu überprüfen, wurde aus Monozyten und MoDC die RNA isoliert und durch RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden die mRNA der Chemokinrezeptoren nachgewiesen.

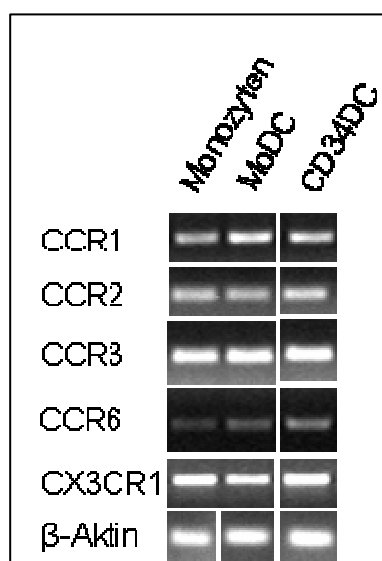


Abb.3.1.7 Expression von Chemokinrezeptoren in Monozyten, MoDC und CD34DC (d7)

Die mRNA aus Monozyten, MoDC und CD34DC wurde aufgereinigt und mittels RT-PCR umgeschrieben. Mit Chemokinrezeptor-spezifischen Oligonukleotiden wurde die Expression der jeweiligen Gene nachgewiesen. Zur Kontrolle der PCR und als Ladekontrolle im Gel wurde β-Aktin als konstitutiv exprimiertes Gen nachgewiesen. Die Ergebnisse der RT-PCR der CD34DC werden in Abschnitt 3.1.2 besprochen.

Wie in Abb.3.1.7 zu sehen, ergab die Analyse der Expression der Chemokinrezeptoren mittels RT-PCR ein anderes Ergebnis als die FACS-Analyse. MoDC an d7 exprimierten mRNA aller getesteten Chemokinrezeptoren und im Vergleich zu den Monozyten war die Menge von mRNA in den MoDC gleich groß. Als Ladekontrolle und als Kontrolle der PCR wurde das PCR-Produkt eines konstitutiv exprimierten Gens, β -Aktin im Gel mit aufgetragen.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse der zwei Methoden zeigen, dass, obwohl kein Protein auf der Oberfläche der MoDC mit FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte, dennoch spezifische mRNA der Chemokinrezeptoren in den MoDC exprimiert wurde. Möglicherweise wurde das Protein unterhalb der Sensitivitätsgrenze des FACS-Gerätes exprimiert. Als Ergebnis kann jedoch festgestellt werden, dass Monozyten im Verlauf der Differenzierung zu DC die Expression der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche vermindern, wohingegen die Gene der Chemokinrezeptoren weiterhin transkribiert werden.

Expression von Integrinen auf MoDC

Die Kultivierung der Monozyten mit GM-CSF und IL-4 wirkte sich auch auf die Expression der Integrine aus. Sowohl an d3 als auch an d7 exprimierten alle Subpopulationen der MoDC die β -Integrine CD18 und CD29. Allerdings nahm während der Differenzierung der rFI auf den einzelnen MoDC Subpopulationen ab. Die β -Integrine wurden deutlich stärker auf Monozyten exprimiert als auf CD14_{pos} Zellen an d3 und d7, wobei CD18 immer stärker exprimiert wurde als CD29. Auf DP und CD1a_{pos} Zellen nahm der rFI beider Moleküle von d3 zu d7 ab. An d7 exprimierten CD1a_{pos} MoDC mehr CD18 als CD14_{pos} und DP Zellen. Die Differenzierung zu MoDC führte zu einem deutlich stärkeren Verlust von CD29 auf der Zelloberfläche im Vergleich zu CD18. CD14_{pos} Zellen exprimierten an allen Tagen mehr CD29 als DP und CD1a_{pos} MoDC (Abb.3.1.8 und Tabelle I im Anhang).

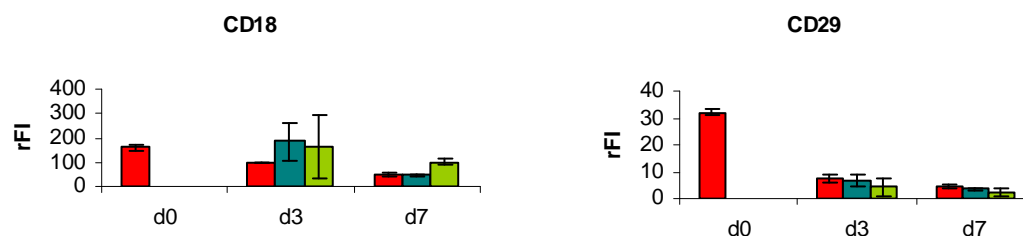


Abb. 3.1.8 Expression der β -Integrine CD18 und CD29 auf Monozyten und MoDC

Monozyten wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF sieben Tage kultiviert. An d0, d3 und d7 wurden sie mit monoklonalen Antikörpern gegen die β -Integrine CD18 und CD29, die indirekt an FITC gekoppelt wurden sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der rFI der FITC-Fluoreszenz auf den Subpopulationen der MoDC an den unterschiedlichen Zeitpunkten als Mittelwert von n=3 (+/-SD).

Die α -Integrine CD11a, CD11b und CD11c wurden von allen MoDC Subpopulationen exprimiert. Jedoch wurden ähnlich wie bei den β -Integrinen Unterschiede in der Stärke der Expression beobachtet (Abb.3.1.9). Monozyten an d0 exprimierten am stärksten CD11a im Vergleich zu CD14_{pos} Zellen an d3 und an d7. DP und CD1a_{pos} MoDC exprimierten jeweils ähnliche Mengen CD11a an d3 und insgesamt weniger an d7. Ein anderes Expressionsmuster wurde für CD11b und CD11c beobachtet. DP und CD1a_{pos} MoDC exprimierten an d3 ähnlich viel CD11b und CD11c wie Monozyten an d0. An d7 wurde am wenigsten CD11b und CD11c auf der Zelloberfläche von CD14_{pos} und DP MoDC gemessen. Die Expression von CD11c auf CD1a_{pos} Zellen blieb dagegen relativ konstant von d3 zu d7.

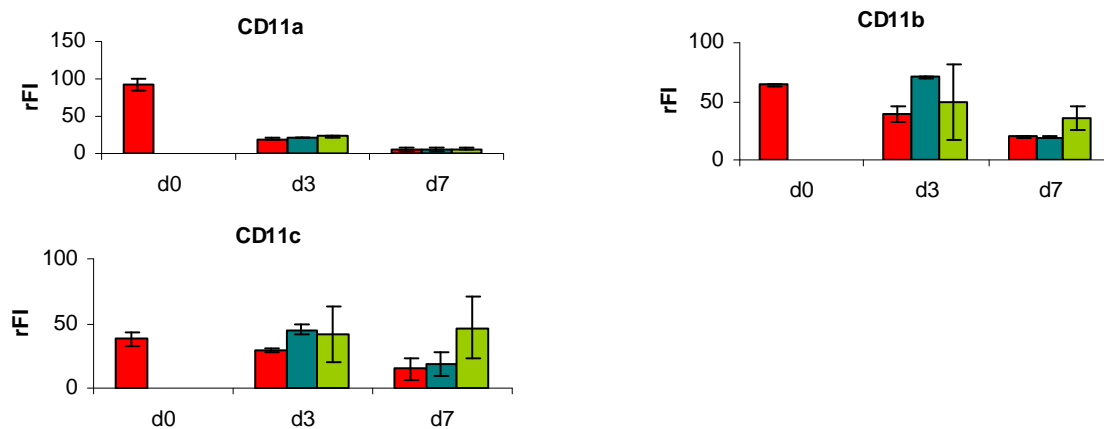


Abb. 3.1.9 Expression der α -Integrine CD11a, CD11b und CD11c auf Monozyten und MoDC

Monozyten wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF sieben Tage kultiviert. An d0, d3 und d7 wurden sie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a, sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen die α -Integrine CD11a, CD11b und CD11c, die indirekt an FITC gekoppelt wurden, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der rFI der FITC-Fluoreszenz auf den Subpopulationen der MoDC an den unterschiedlichen Zeitpunkten als Mittelwert von n=3 (+/-SD).

Monozyten exprimierten die α -Integrine CD49b und CD49f, dagegen waren MoDC an d3 und d7 CD49b und CD49f negativ (nicht gezeigt). CD49c wurde weder von Monozyten noch von MoDC exprimiert (nicht gezeigt). CD49d und CD49e konnten auf MoDC nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um die Expression der Integrine mit einer zweiten Methode zu validieren, wurde RT-PCR mit RNA aus Monozyten und aus MoDC von d3 und d7 durchgeführt.

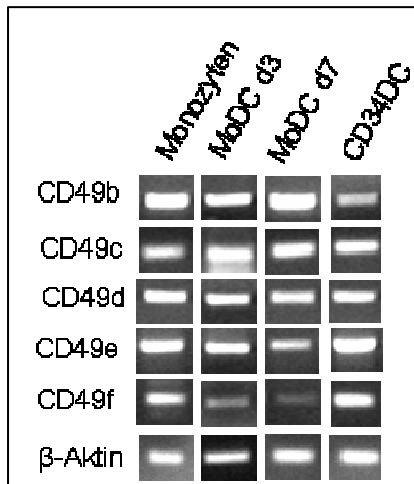


Abb.3.1.10 Expression von α -Integrinen CD49b-f in Monozyten, MoDC d3 und d7 und CD34DC

Die mRNA aus Monozyten, MoDC an d3 und d7 wurde aufgereinigt und mit RT-PCR umgeschrieben. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden wurde die Genexpression von CD49b, CD49c, CD49d, CD49e und CD49f nachgewiesen. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde als Kontrolle β -Aktin nachgewiesen. Die Ergebnisse der RT-PCR der CD34DC werden in Abschnitt 3.1.2 besprochen.

Von CD49b, CD49c, CD49d, CD49e und CD49f konnte mRNA sowohl in Monozyten als auch in MoDC nachgewiesen werden (Abb.3.1.10). Während der Differenzierung von Monozyten zu MoDC nahm die nachweisbare Konzentration der mRNA von CD49f ab.

Die Phänotypisierung der Monozyten und MoDC zeigte zum einen, dass Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 schon nach drei Tagen zu MoDC differenzierten. Monozyten exprimierten die untersuchten Chemokinrezeptoren, mit Ausnahme von CCR6, stärker auf der Oberfläche als die MoDC. Die Expression der Integrine auf der Zelloberfläche nahm bei den MoDC ebenfalls mit zunehmender Differenzierung ab, wobei die Expression der mRNA der α -Integrine mit Ausnahme von CD49f konstant blieb.

Insgesamt zeigte sich, dass Monozyten sowohl die Chemokinrezeptoren als auch die Integrine stärker als die MoDC exprimierten. Da die MoDC aus den Monozyten generiert wurden, könnte die Abnahme der für die Immigration in die Gewebe relevanten Faktoren Hinweise auf die *in vivo* Situation geben, da Immigration von Monozyten in ein Gewebe zur Differenzierung führt (Randolph et al., 1998).

3.1.3 Aus Stammzellen (CD34_{pos} Zellen) generierte DC

Als Alternative zu Monozyten aus dem peripheren Blut bieten sich als Langerhans Vorläuferzellen CD34 positive Stammzellen an. Diese wurden über einen CD34 spezifischen Antikörper mit Hilfe der MACS-Technologie aus frischem Nabelschnurblut isoliert und mit GM-CSF, TNF- α , FLT-3L und SCF in Kultur genommen (siehe 2.3.4). Nach vier Tagen wurde zusätzlich TGF- β 1 zu den Zellen gegeben. Der Phänotyp der Zellen wurde nach vier und nach sieben Tagen anhand der Expression von CD14 und CD1a bestimmt. Nach vier Tagen waren die Zellen zu CD14_{pos} und CD1a_{pos} Zellen differenziert (Abb.3.1.11). 9-21 % der Zellen exprimierten nur CD14 und 7-27% exprimierten nur CD1a. Nur 1-4 % der Zellen

coexprimierten CD14 und CD1a (doppelpositive Zellen (DP Zellen)). Der größte Teil der Zellen war CD14- und CD1a-negativ (doppelnegative Zellen (DN Zellen)).

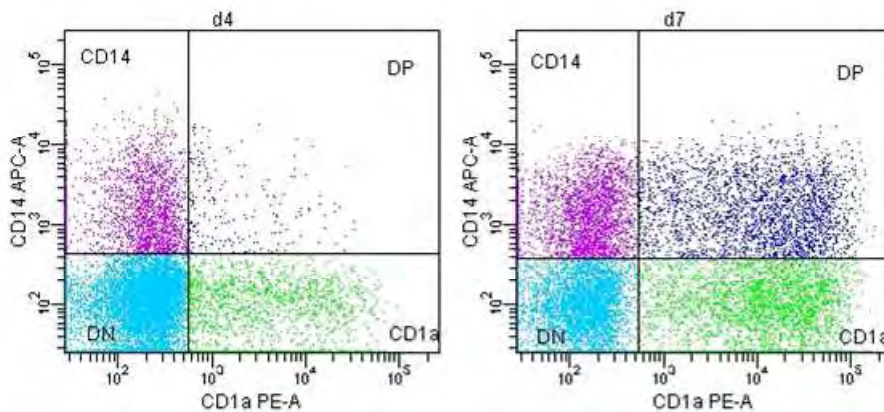


Abb.3.1.11 Differenzierung von CD34_{pos} Zellen zu CD34DC

CD34_{pos} Zellen wurden aus frischem Nabelschnurblut aufgereinigt und in Kultur genommen. An d4 und d7 wurden die kultivierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 (gekoppelt an APC) und CD1a (gekoppelt an PE) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In die Analyse wurden nur lebende Zellen, die nach Färbung mit 7-AAD negativ waren, einbezogen. Dargestellt ist die Fluoreszenz von APC und PE auf den Zellen als Punktdiagramm. Der Quadrant wurde aufgrund der Färbung mit unspezifischen Antikörpern gleichen Isotypes gesetzt. CD14-positive Zellen = violette Punkte, doppelt positive Zellen (DP) = blaue Punkte, doppelt negative Zellen (DN) = hellblau, CD1a-positive Zellen = grüne Punkte.

Expression von Chemokinrezeptoren auf CD34DC

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Monozyten exprimierten die CD34DC die untersuchten Chemokinrezeptoren geringer, abweichend davon war jedoch die starke Expression von CCR6 auf den CD34DC (Abb.3.1.12). CCR1 wurde nur an d4 auf den CD14_{pos} CD34DC nachgewiesen, allerdings sehr schwach exprimiert. An d7 waren alle CD34DC CCR1-negativ (Abb.3.1.12). Dennoch wurde mit RT-PCR CCR1-spezifische mRNA in den CD34DC nachgewiesen (Abb.3.1.7). CCR2 wurde nur auf der Oberfläche von CD14_{pos} Zellen nachgewiesen, die Expression war jedoch sehr niedrig und blieb bis d7 auf diesem Niveau. CX₃CR1 wurde nur sehr gering hauptsächlich auf den CD14_{pos} CD34DC exprimiert. Mit RT-PCR konnte in den CD34DC CX₃CR1 spezifische mRNA nachgewiesen werden (Abb.3.1.7).

Alle Subpopulationen der CD34DC waren an d4 CCR6-positiv (Abb.3.1.12). DP und CD1a_{pos} CD34DC exprimierten gleiche Mengen CCR6 auf der Oberfläche. CD14_{pos} und eine Subpopulation der DN Zellen exprimierten ebenfalls CRR6, allerdings deutlich geringer als die beiden anderen Populationen. Auch an d7 waren alle Subpopulationen der CD34DC

CCR6-positiv, allerdings hatten DP CD34DC einen leicht höheren rFI Wert als die CD1a_{pos} Zellen. Diese auf CCR6 bezogenen Ergebnisse wurden durch RT-PCR bestätigt (Abb.3.1.7).

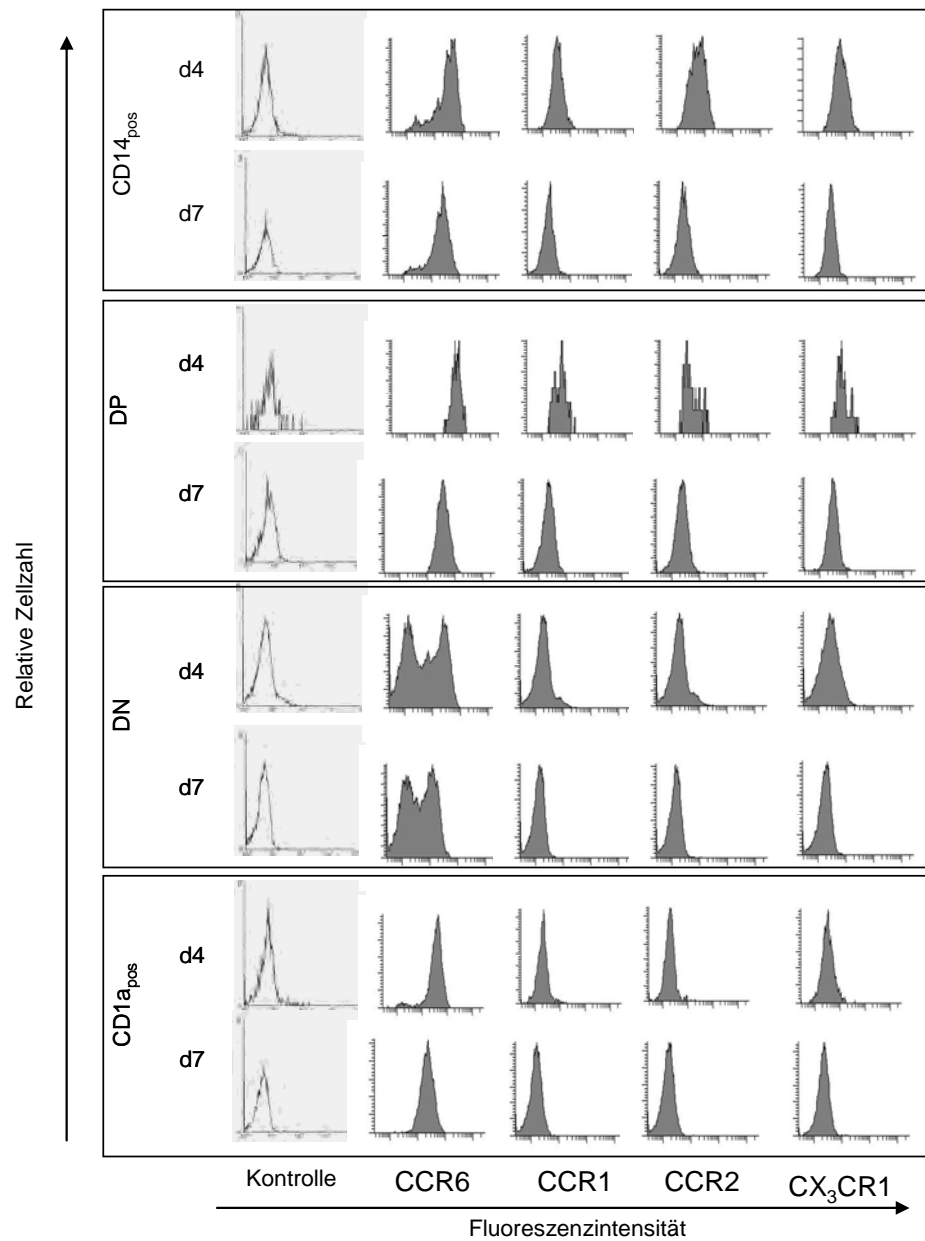


Abb.3.1.12 Expression der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von CD34DC

CD34DC wurden an d4 und d7 mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt, zusätzlich wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Chemokinrezeptoren, die indirekt an FITC gekoppelt wurden, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Subpopulationen der CD34DC wurden durch Quadrantenanalyse anhand der Färbung von unspezifischen Antikörpern gleichen Isotyps ermittelt. Aufgetragen ist die Zellzahl gegenüber der Fluoreszenzintensität der FITC-Färbung auf den analysierten CD34DC. Als Kontrolle für die FITC-Färbung wurde ein unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps ausgewählt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3.

Das Ergebnis der Chemokinrezeptor-Analyse zeigt, dass CD34DC, Monozyten und MoDC ähnliche Chemokinrezeptoren exprimierten. Die CD14_{pos} Subpopulation der CD34DC

exprimierte allerdings die untersuchten Chemokinrezeptoren deutlich geringer als die Monozyten. MoDC und die CD1a-positiven Subpopulationen der CD34DC exprimierten ein ähnliches Muster der untersuchten Chemokinrezeptoren.

Expression von Integrinen auf CD34DC

Wie für die MoDC wurden auch die Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche der CD34DC untersucht. Die β -Integrine CD18 und CD29 wurden auf den CD14_{pos} Zellen an d4 und d7 exprimiert (Abb. 3.1.13). An d4 war die Expression von CD18 und CD29 stärker als an d7. Die anderen CD34DC Populationen waren ebenfalls CD18- und CD29- positiv, aber schwächer als die CD14_{pos} CD34DC.

Alle CD34DC exprimierten an beiden untersuchten Zeitpunkten das α -Integrin CD11a, jedoch wurde CD11a von den CD14_{pos} Zellen stärker exprimiert. CD11b wurde ebenfalls auf allen Subpopulationen nachgewiesen, wobei die DN CD34DC am geringsten CD11b exprimierten. Die DP Zellen exprimierten am stärksten CD11b auf ihrer Oberfläche; auf der Zelloberfläche von CD14_{pos} CD34DC nahm die Expression von CD11b von d4 zu d7 ab. CD11c wurde am stärksten von der DP Subpopulation exprimiert. Die Expression von CD11c nahm auf den DP und den CD1a_{pos} von d4 zu d7 leicht zu. Konstant blieb die Expression von CD11c auf den CD14_{pos} und den DN Zellen, die am schwächsten CD11c exprimierten.

Die α -Integrine CD49b und CD49c konnten nicht auf der Zelloberfläche von CD34DC nachgewiesen werden (Abb.3.1.13). CD49d konnte nur an d7 auf den CD34DC nachgewiesen werden (nicht gezeigt). An beiden Zeitpunkten waren alle CD34DC CD49e-positiv (nicht gezeigt). CD49f wurde nur schwach von der DN Subpopulation an d4 und d7 exprimiert (Abb. 3.1.13).

Mit RT-PCR wurde die mRNA von den α -Integrinen CD49c, CD49d, CD49e und CD49f nachgewiesen (Abb.3.1.10). CD49b mRNA wurde nur in der DN Subpopulation nachgewiesen (nicht gezeigt).

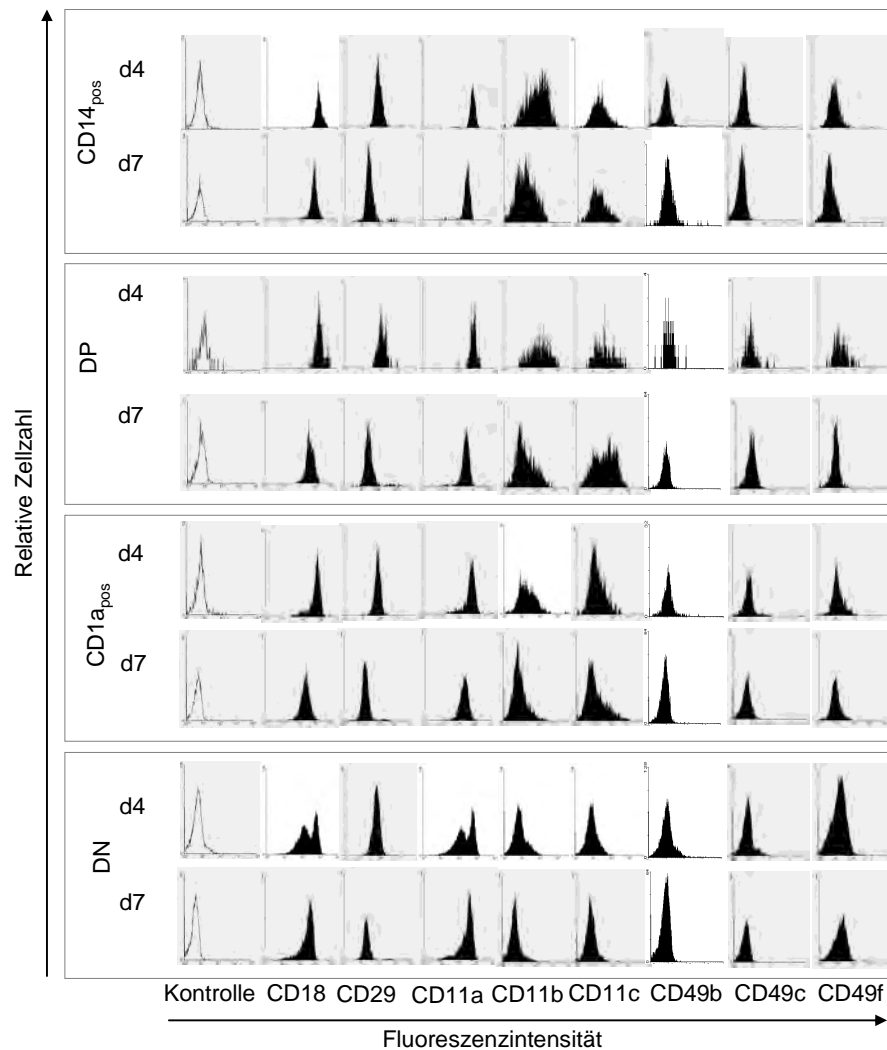


Abb. 3.1.13 Expression von Integrinen auf CD34DC an d4 und d7

CD34DC wurden an d4 und d7 mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt, zusätzlich wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Integrine, die indirekt an FITC gekoppelt wurden, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Subpopulationen der CD34DC wurden durch Quadrantenanalyse anhand der Färbung von unspezifischen Antikörpern gleichen Isotyps ermittelt. Aufgetragen ist die Zellzahl gegenüber der Fluoreszenzintensität der FITC-Färbung auf den analysierten CD34DC. Als Kontrolle für die FITC-Färbung wurde ein unspezifischer Antikörper eines Isotypen ausgewählt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von $n=3$.

Anders als bei der Differenzierung von Monozyten zu MoDC nahm die Expression der Integrine auf der Oberfläche der CD34DC nicht im Verlauf der Differenzierung pauschal ab. Die Expression der Integrine blieb eher konstant auf den CD34DC, oder wurde in Einzelfällen von d4 zu d7 verstärkt. Die Subpopulationen der CD34DC exprimierten sowohl die α -Integrine wie auch die β -Integrine deutlich heterogener als die Monozyten und auch als die MoDC.

Die CD34DC Subpopulationen hatten sowohl bezogen auf die Expression der Chemokinrezeptoren wie auch der Integrine einen anderen Phänotyp, als die Subpopulationen

der Monozyten und auch der MoDC. Allerdings konnte durch die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DC bei beiden Zelltypen Veränderungen bei der Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren beobachtet werden.

3.1.4 Expression von Langerin

Eines der Hauptmerkmale, in dem sich Langerhans Zellen von anderen DC unterscheiden, ist die Expression von Langerin. Langerin ist assoziiert mit den Birbeck Granula, die nur in den Langerhans Zellen vorkommen. Um zu beweisen, dass die verschiedenen Vorläuferzellen zu Langerhans Zellen differenzieren können, wurden MoDC an d4 mit oder ohne TGF- β 1 kultiviert. TGF- β 1 ist entscheidend für die Induktion der Langerin Expression in DC (Geissmann et al., 1998).

Langerin auf MoDC

Nach sieben Tagen Kultivierung wurden MoDC auf die Expression von Langerin auf der Zelloberfläche untersucht. Nur die CD1a_{pos} Subpopulation exprimierte abhängig von der Zugabe von TGF- β 1 Langerin (grüne Punkt wolke in Q2) (Abb.3.1.14). DP und CD14_{pos} MoDC blieben auch in Anwesenheit von TGF- β 1 Langerin-negativ. Obwohl es einen geringen Anteil (4,9%) von Zellen gab, die spontan, ohne TGF- β 1, Langerin exprimierten, exprimierten mit TGF- β 1 behandelte Zellen deutlich mehr Langerin (10,6%).

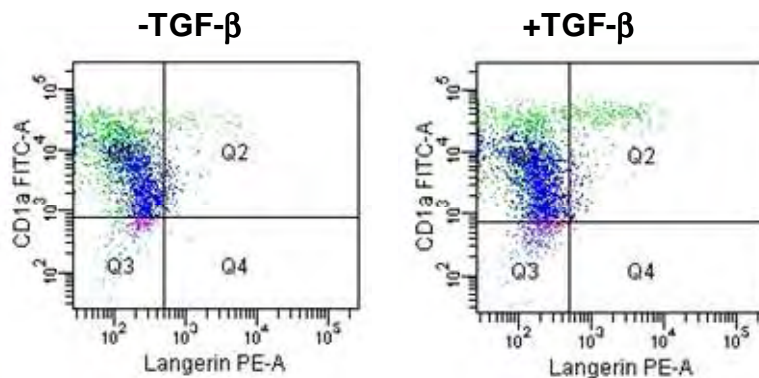


Abb.3.1.14 Expression von Langerin auf MoDC an d7

Monozyten wurden sieben Tage mit GM-CSF und IL-4 kultiviert, ein Teil der MoDC wurde ab d4 mit TGF- β 1 kultiviert. An d7 wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Langerin und CD14 gefärbt, zusätzlich wurden sie noch mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CD1a, der indirekt an FITC gekoppelt wurde, gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurden die Subpopulationen durch Quadrantenanalyse definiert, wobei die grüne Punkt wolke: CD1a_{pos}, die blaue Punkt wolke: DP, violette Punkt wolke: CD14_{pos} Zellen entsprechen. In den gezeigten Punktdiagrammen ist die Fluoreszenz von Langerin-PE gegenüber der von CD1a-FITC aufgetragen. Die Quadranten wurden aufgrund der Färbung mit einem unspezifischen Antikörper mit gleichem Isotyp gesetzt.

Dieses Ergebnis bewies, dass Monozyten unter Zugabe von GM-CSF, IL-4 und TGF- β 1 zu Langerhans Zellen-ähnlichen Zellen differenzieren können. Langerin wurde nur von den CD1a_{pos} MoDC exprimiert, der größte Teil der MoDC blieb Langerin-negativ.

Langerin auf CD34DC

Auch CD34DC wurden auf die Expression von Langerin untersucht. Im Gegensatz zu den MoDC wurde TGF- β 1 standardmäßig an d4 zu den CD34_{pos} Zellen hinzugegeben, außerdem wurden CD34_{pos} Zellen immer ohne IL-4 kultiviert.

Anders als bei den MoDC exprimierten innerhalb der CD34DC nicht nur die CD1a_{pos} Zellen Langerin an d7, die DP Population war ebenfalls Langerin-positiv. An d4 exprimierten alle Subpopulationen zu einem sehr geringen Anteil Langerin (5-13 %). Durch die Behandlung mit TGF- β 1 wurden CD14_{pos} und DN Zellen Langerin-negativ, die CD1a-exprimierenden CD34DC steigerten die Expression von Langerin (18-24 %) (Abb.3.1.15). Die Langerin-Expression war bei den DP Zellen immer ein wenig stärker als bei den CD1a_{pos} Zellen.

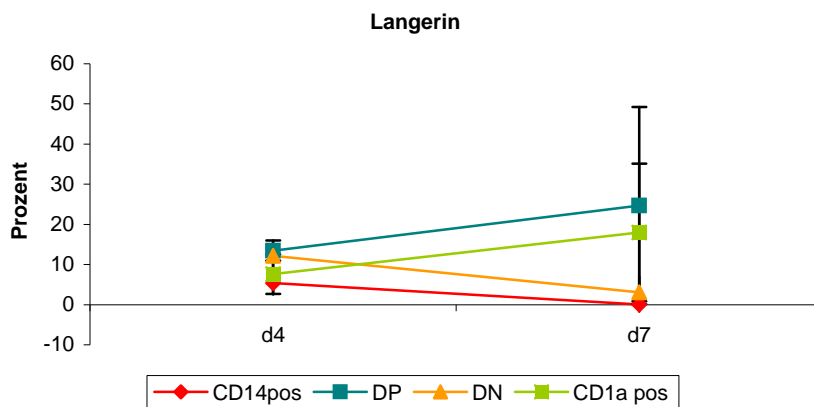


Abb.3.1.15 Expression von Langerin auf CD34DC unter Zugabe von TGF- β 1

CD34DC wurden ab d4 mit TGF- β 1 kultiviert. An d4 und an d7 wurde die Expression von Langerin auf der Zelloberfläche im Durchflusszytometer bestimmt. Die CD34DC wurden anhand der Färbung gegen CD14 und CD1a in vier Subpopulationen unterteilt, und anschließend die Färbung des monoklonalen Antikörpers gegen Langerin auf den einzelnen Subpopulationen analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Langerin positiven Zellen als Mittelwert von n=4 +/-SD.

Im Vergleich zu den MoDC begannen unter Zugabe von TGF- β 1 deutlich mehr CD34DC Langerin zu exprimieren. Bei den MoDC war nur ein Teil der CD1a_{pos} Zellen Langerin-positiv, wobei bei den CD34DC beide CD1a-exprimierenden Subpopulationen Langerin exprimierten.

3.1.5 Differenzierung der einzelnen CD34DC Subpopulationen

Da innerhalb der CD34DC an d4 kaum DP Zellen vorkamen, dies sich jedoch bis d7 änderte, sollte in dem folgenden Experiment der Verlauf der Differenzierung zu den einzelnen Subpopulationen geklärt werden. CD34DC wurden aus Stammzellen generiert, die durch Kultivierung proliferieren, die Sortierung wurde an d7 durchgeführt. Zu früheren Zeitpunkten war die Zellzahl zu gering, um die Zellen zu sortieren. Die CD34DC wurden an d7 in die vier Populationen, entsprechend ihrer Expression von CD1a oder CD14, sortiert. Nach der Sortierung wurde die Reinheit der Subpopulationen immunzytometrisch analysiert (Direkt nach Sort). Abb.3.1.16 zeigt die prozentualen Anteile der Subpopulationen, wie sie direkt nach Sortierung sowie nach Kultivierung mit und ohne GM-CSF gefunden wurden ((a)=CD14_{pos}, (b)=DP, (c)=DN, (d)=CD1a_{pos} Zellen).

84% der als CD14_{pos} Subpopulation sortierten Zellen (rot) waren tatsächlich CD14-positive Zellen. Unter 5% als CD14_{pos} Subpopulation sortierte Zellen exprimierten entweder noch CD1a oder waren CD14/CD1a-doppelnegativ. Die Reinheit der drei anderen sortierten Subpopulationen lag ebenfalls zwischen 80-90 %.

Die sortierten Zellen wurden mit oder ohne GM-CSF kultiviert, optional wurde zusätzlich TGF- β 1 zu den Zellen gegeben. Aufgrund von Zellmangel wurden keine DP CD34DC mit GM-CSF in Kultur genommen, diese Bedingung fehlt. Nach zwei Tagen wurden die sortierten und kultivierten Zellen erneut durch FACS-Analyse auf die Expression von CD14 und CD1a untersucht (d2 nach Sort) (Abb.3.1.16).

Die gestrichelten Linien in den Diagrammen von Abb.3.1.16 entsprechen den Bedingungen ohne GM-CSF, die Entwicklung von Zellen kultiviert mit GM-CSF ist dagegen mit durchgezogenen Linien dargestellt.

GM-CSF erwies sich als entscheidend für die Induktion der CD1a-Expression auf den Zellen. Die als CD14_{pos} Subpopulation sortierten Zellen (rot) begannen nach zwei Tagen Kultivierung mit GM-CSF zusätzlich noch CD1a zu exprimieren (b). Ohne GM-CSF veränderte sich der Phänotyp der CD14_{pos} Subpopulation nicht (a). Die DN sortierten Zellen (gelb) differenzierten unter Zugabe von GM-CSF sowohl zu CD14_{pos} Zellen (a) wie auch zu DP Zellen (c). Nur ein kleiner Teil der ehemals DP sortierten Zellen (blau) differenzierte zu CD1a einfach positiven Zellen ohne GM-CSF (d). Der Anteil nur CD1a-exprimierender Zellen innerhalb der als CD1a_{pos} sortierten Zellen (grün) nahm während der zwei Tage Kultivierung ab (d), ein Teil der Zellen begann, neben CD1a auch CD14 zu exprimieren, unabhängig von der Zugabe von GM-CSF (b).

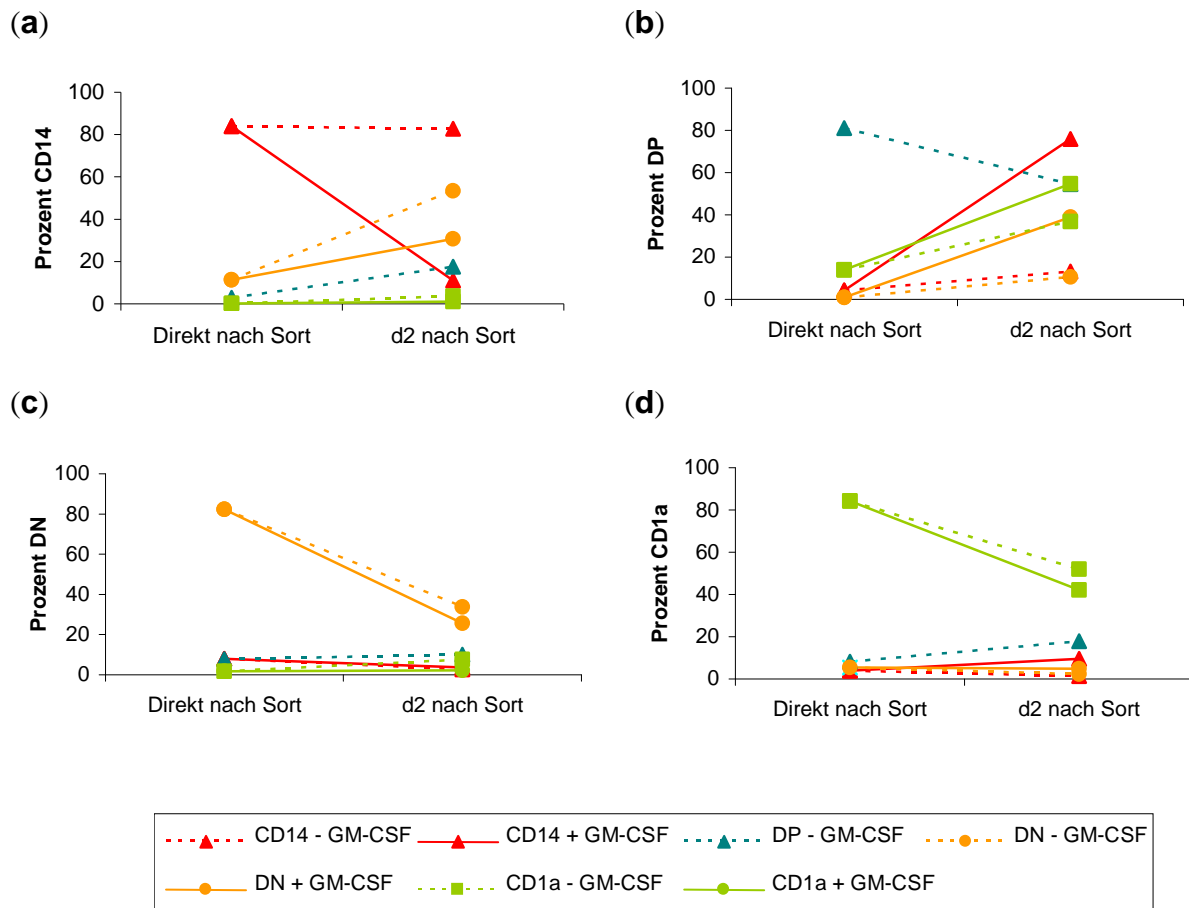


Abb.3.1.16 Ontogenese der CD34DC Subpopulationen (Sortier-Experiment)

CD34DC Zellen wurden an d7 in die vier Subpopulationen, entsprechend der Expression von CD1a und CD14, sortiert. Die sortierten Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von GM-CSF 48h weiterkultiviert. Es wurden keine sortierten DP Zellen mit GM-CSF kultiviert, da zu wenige DP Zellen nach der Sortierung vorhanden waren. Nach zwei Tagen wurden die sortierten und kultivierten Zellen hinsichtlich der Expression von CD1a und CD14 immunzytometrisch analysiert. Die vier Diagramme entsprechen dem Expressionsmuster innerhalb der CD34DC, wobei jeweils der prozentuale Anteil der (a) CD14_{pos}, (b) DP, (c) DN, (d) CD1a_{pos} Zellen pro Diagramm dargestellt ist. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis für n=2.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die sortierten Zellen neben GM-CSF noch optional mit TGF- β 1 für 48h kultiviert. Dabei sollte geklärt werden, ob sich die Zugabe von TGF- β 1 ebenfalls auf die Differenzierung von CD34DC zu CD1a-positiven Zellen auswirkte und welche Subpopulationen darüber hinaus noch induziert werden, Langerin zu exprimieren.

Die Zugabe von TGF- β 1 zeigte keine Wirkung auf die CD1a-Expression auf den sortierten CD34DC (nicht gezeigt). TGF- β 1 wirkte jedoch entscheidend auf die Expression von Langerin in den sortierten Zellen ein (Abb.3.1.17). Unter Zugabe von TGF- β 1 verstärkten die als DP Zellen sortierten Zellen (blau) die Expression von Langerin. DN sortierte Zellen (gelb), die teilweise durch Zugabe von GM-CSF zu CD1a_{pos} oder zu DP CD34DC differenziert waren, wurden durch TGF- β 1 induziert, Langerin zu exprimieren. Als CD1a_{pos}

CD34DC sortierte Zellen (grün) wurden unter dem Einfluss von TGF- β 1 induziert, Langerin stärker zu exprimieren. CD14_{pos} Zellen konnten in diesem Experiment nicht eingesetzt werden, da nach Sortierung zu wenige Zellen zur Verfügung standen.

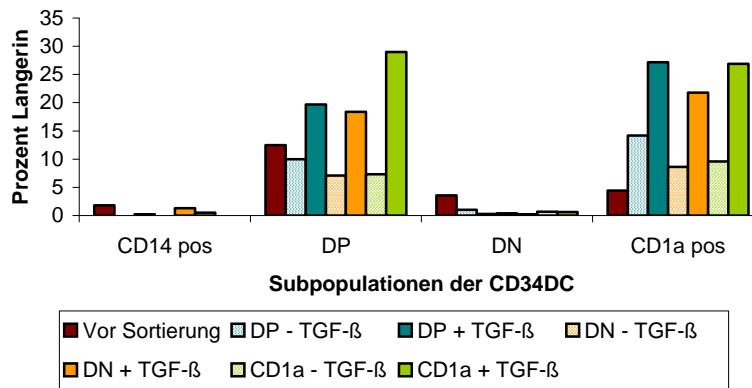


Abb.3.1.17 Einfluss von TGF- β 1 auf die Expression von Langerin in sortierten CD34DC Entsprechend der Expression von CD1a und CD14 sortierte CD34DC wurden 48h mit GM-CSF und optional mit TGF- β 1 kultiviert. Danach wurden die Zellen auf die Expression von CD1a und CD14 erneut im Durchflusszytometer analysiert, zusätzlich wurden die Zellen noch mit einem monoklonalen Antikörper gegen Langerin gefärbt. Die einzelnen Subpopulationen wurden auf die Expression von Langerin analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Langerin positiven CD34DC als ein repräsentatives Ergebnis von n=2.

Das Ergebnis der Sortierung der CD34DC in die jeweiligen Subpopulationen mit anschließender Rekultivierung mit GM-CSF oder TGF- β 1 zeigte zunächst, dass die vier Populationen sich in einem Stadium befinden, in dem sie noch weiterdifferenzieren können. Sie entsprechen demnach Vorläuferzellen, die zu Effektorzellen differenzieren können. Das Stadium der CD1a einfach positiven CD34DC entspricht wahrscheinlich der fertig differenzierten Langerhans Zelle, wobei auch diese Zellen nach Kultur mit GM-CSF wieder CD14 exprimieren konnten. Die DP Zellen stellen ein Zwischenstadium dar, dessen Weichen schon in Richtung Langerhans Zelle gestellt sein könnten. Die DP Zellen differenzieren zum einen aus den CD14_{pos} Zellen, zum anderen direkt aus dem DN Zellstadium.

3.2 Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und Kontakt der Langerhans Vorläuferzellen mit Endothelzellen

Potentielle Langerhans Vorläuferzellen müssen auf dem Weg aus dem Blut in die Epidermis mit unterschiedlichen Zellen interagieren, die von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben sind. Diese Matrix wird durch Proteine aufgebaut, die von den Zellen in das Außenmilieu abgegeben werden. Die ECM vermittelt unter anderem interzellulären Kontakt. Zunächst treten die Vorläuferzellen in Kontakt mit der Basalmembran der Endothelzellen,

gefolgt von der dermalen Matrix der Fibroblasten und zuletzt mit der Basalmembran, die von Keratinozyten gebildet wird.

Um das Adhäsionsverhalten der Subpopulationen von MoDC und CD34DC zu untersuchen, wurden die Zellen mit Proteinen der ECM in Interaktion gebracht. Hierzu wurde ein *in vitro* Adhäsions-Test durchgeführt, in dem zunächst eine Zellkulturplatte mit rekombinanten Proteinen der ECM beschichtet wurde und anschließend die Vorläuferzellen auf die beschichtete Oberfläche gegeben wurden. Nicht adhärenente Zellen wurden abgewaschen und adhärenente Zellen fixiert und fotografiert. Zur Quantifizierung der adhärenierten Zellen wurde die optische Dichte ermittelt. Weiterhin wurden die adhärenenten Zellen auf die Expression von CD14 und CD1a analysiert.

3.2.1 Adhäsion von CD34DC und MoDC an Proteine der ECM

Die Adhäsion von MoDC und CD34DC an Proteine der ECM wurde an d7 untersucht. Als Bestandteile der Basalmembran wurden Laminin 111, Laminin 332 und Collagen IV eingesetzt, für die dermale Matrix wurden Fibronectin und Collagen I ausgewählt. Sowohl MoDC als auch CD34DC adhärenierten spezifisch an Laminin 332 und Fibronectin (Abb.3.2.1). Die Morphologie der Zellen, die an Laminin 332 und an Fibronectin gebunden hatten, war ausgestreckt und zeigte viele Ausläufer. Die Zellen, die unspezifisch an Laminin 111, Collagen I und Collagen IV gebunden hatten, zogen eine runde Morphologie, ebenso wie bei der Negativkontrolle Rinderserum Albumin (BSA) (nicht gezeigt).

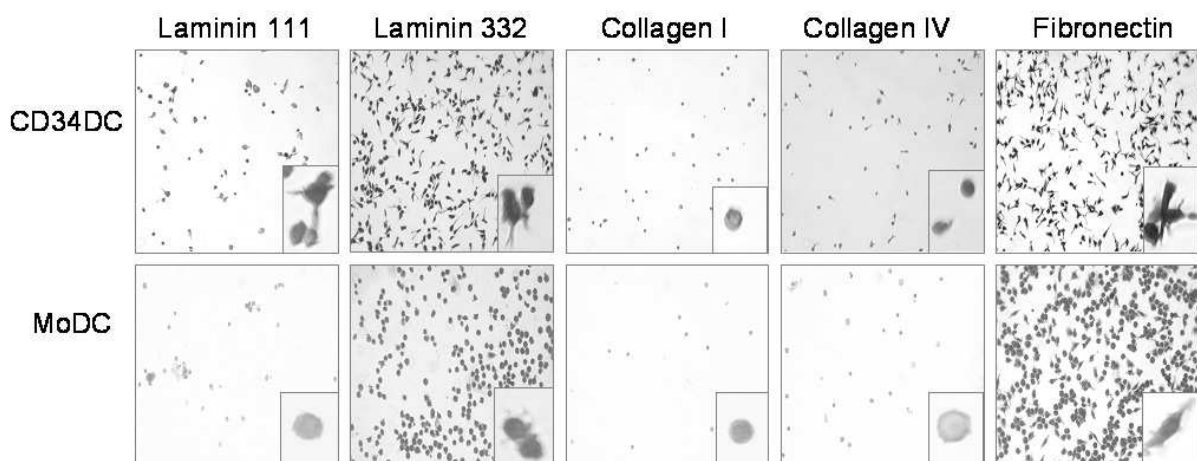


Abb.3.2.1 Adhäsion von CD34DC und MoDC an Proteine der ECM

CD34DC und MoDC (an d7) wurden in 96-Lochplatten inkubiert, die zuvor mit unterschiedlichen Proteinen der ECM beschichtet waren. Die adhärenenten Zellen wurden nach 45 min. Inkubation fixiert, gefärbt und fotografiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3-4. Vergrößerung: 200x, Kästchen: 1500x

Zur Quantifizierung des Adhäsionsverhaltens wurde die optische Dichte (OD) ermittelt, um zu vergleichen, an welches Protein die meisten Zellen adhäreniert hatten (Abb.3.2.2). CD34DC

adhärierten in allen Experimenten weniger an die ECM Proteine als MoDC. Beide Zellsorten adhärierten am stärksten an Fibronectin.

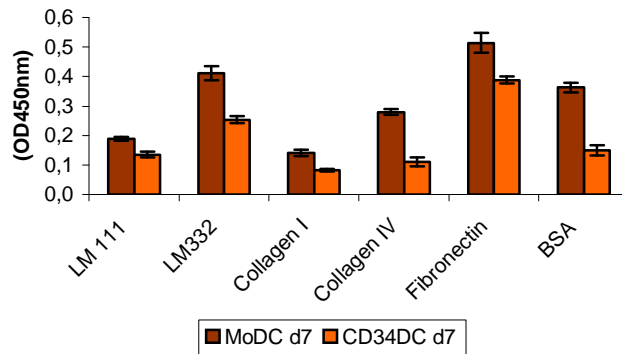


Abb.3.2.2 Optische Dichte der an Proteine der ECM adhären DC

CD34DC und MoDC (an d7) wurden in 96-Lochplatten 45 min. inkubiert, die zuvor mit unterschiedlichen Proteinen der ECM beschichtet waren. Die adhären Zellen wurden fixiert, gefärbt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Je mehr Zellen an die Proteine adhären, desto größer war die OD. Die Balken stellen Mittelwerte aus Triplikaten (+/- SD) dar. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3-4.

Um zu untersuchen, welche der Subpopulationen innerhalb der CD34DC an Laminin 332 oder Fibronectin gebunden hatten, wurden die adhären Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a oder CD14 immunhistologisch gefärbt. Von den CD34DC, die an Fibronectin gebunden hatten, waren 2-6 % CD14-positiv. Dagegen exprimierten 30-70 % der adhären Zellen CD1a. Genau gegensätzlich war das Ergebnis der Färbung der an Laminin 332 adhären Zellen. Hier waren 50-100 % der Zellen CD14-positiv und nur 20-60 % der Zellen exprimierten CD1a (Abb.3.2.3, Tabelle II im Anhang).

Hier nicht dargestellt ist das Ergebnis der spezifischen Färbung der adhären MoDC. Da beinahe alle MoDC CD1a exprimierten, waren alle an Fibronectin oder Laminin 332 adhären MoDC CD1a-positiv. Dagegen waren die adhären MoDC nicht CD14-positiv. Obwohl beide DC Typen (MoDC und CD34DC) an die gleichen Substrate spezifisch adhären, konnte im Vergleich zu den MoDC bei den CD34DC ein differenziertes Adhäsionsverhalten innerhalb der Subpopulationen beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass nur alle ausdifferenzierten CD1a-positiven MoDC an die Proteine banden, wohingegen bei den CD34DC auch die CD14-exprimierenden Zellen an Laminin 332 adhären. Ob die CD14_{pos} Zellen oder die DP CD34DC an Laminin 332 adhären, kann mit der Färbemethode nicht geklärt werden.

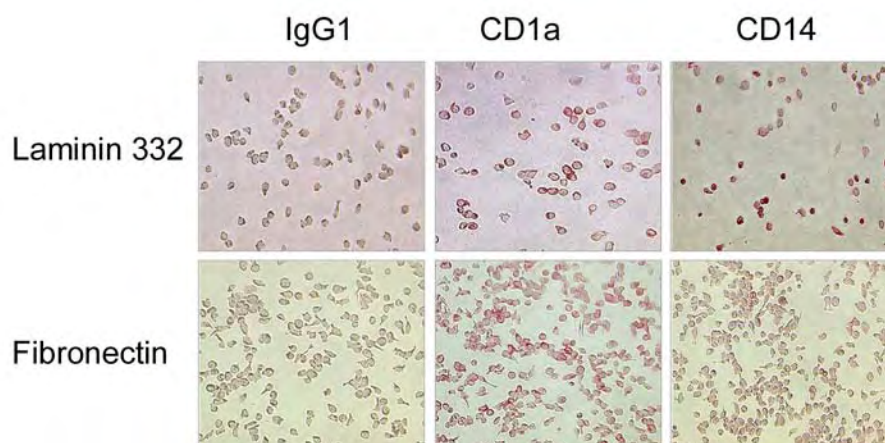


Abb.3.2.3 CD34DC Subpopulationen binden unterschiedlich an Laminin 332 und Fibronectin

CD34DC an d7 adhären innerhalb von 45 min. an Laminin 332 oder Fibronectin. Die adhären Zellen wurden fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen CD14 oder CD1a immunhistologisch gefärbt und fotografiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps gefärbt. Als positive Zellen sind rot angefarbte Zellen zu erkennen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3.

3.2.2 Rolle des Endothels

Auf ihrem Weg aus dem Blut in die Epidermis treten die Vorläuferzellen zunächst in Kontakt mit den Endothelzellen. Diese sezernieren Chemokine in das Blut oder präsentieren Chemokine aus dem Blut, die auf ihrer Zelloberfläche gebunden sind. Neben diesen chemoattraktiven Funktionen sind die Endothelzellen auch entscheidend für die Immigration von Zellen in die Gewebe. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine oder Selektine, durch die im Blut transportierte Zellen gestoppt werden können, um danach in ein Gewebe immigrieren zu können.

Zur Untersuchung der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen wurde in dieser Arbeit vor allem ein *in vitro* Migrations-Modell eingesetzt, das auf einem zwei-Kammer-System beruht. In diesem Transwell-System werden zwei Kammern von einer porösen Membran voneinander getrennt. In der unteren Kammer befindet sich der auf chemoattraktive Wirkung zu untersuchende Stoff, in die obere Kammer werden die Zellen gegeben. Nach definierter Zeit werden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt. Als spezifische Migration wurde die gerichtete Migration auf ein Chemoattraktans hin definiert, die stärker als die spontane Migration auf das Kontrollmedium hin sein musste.

Um die Rolle der Endothelzellen bei der Einwanderung von Vorläuferzellen in die Haut zu untersuchen, wurde die Migration mit oder ohne humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) in einem Transwell-Migrationsversuch getestet. Hierbei sollte getestet werden, ob die Endothelzellen nur eine zu überwindende Barriere zwischen den

einzelnen Kompartimenten darstellen, oder ob von ihnen durch interzellulären Kontakt Differenzierungsimpulse ausgehen.

Um mögliche Differenzierungssignale zu untersuchen, die durch Kontakt mit den Endothelzellen induziert werden, wurde die Transwell-Membran mit Matrigel™, einem Äquivalent zu der ECM, oder mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet. Als dritte Variante wurden CD34DC auf die unbehandelte Transwell-Membran gegeben. Die Transwell-Membran wurde 24h vor dem Transwell-Experiment zuerst mit Matrigel™ und 4h später mit Endothelzellen beschichtet. In Vorexperimenten wurde die Anzahl der Endothelzellen ermittelt, die nach ca. 20h Inkubation einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten. Als Chemoattraktans wurde in die untere Transwell-Kammer konditioniertes Medium von humanen unstimulierten Keratinozyten (KCM) gegeben. 1×10^6 CD34DC d7 wurden in die obere Kammer des Transwell überführt. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Transwell-Kammer gezählt. Anschließend wurden die migrierten Zellen phänotypisch untersucht, um den Anteil der CD34DC Subpopulationen zu bestimmen.

Abb.3.2.4 zeigt den migratorischen Index (MI) der einzelnen Subpopulationen der CD34DC. Der MI setzt die spontane Migration ins Verhältnis zu der spezifischen Migration. (spezifische Migration/spontane Migration). Bei einem Wert über eins wird von Chemotaxis ausgegangen, definiert als gerichtete Migration entlang eines Gradienten.

Die spezifische Migration der einzelnen Subpopulationen wurde durch die Beschichtung der Transwell-Membran mit Matrigel bzw. mit Matrigel und Endothelzellen verstärkt. Die geringste spezifische Migration wurde bei der unbehandelten Transwell-Membran beobachtet. Unter dieser Bedingung war die spontane Migration aller Subpopulationen am stärksten (nicht gezeigt). CD14_{pos} und CD1a_{pos} Zellen migrierten gleich stark in das KCM. Die stärkste spezifische Migration auf KCM hin wurde für die DP Subpopulation ermittelt. DN Zellen migrierten unter allen drei Bedingungen sehr schwach spezifisch. Spontan migrierten die CD14_{pos} CD34DC unter allen Bedingungen am stärksten (nicht gezeigt).

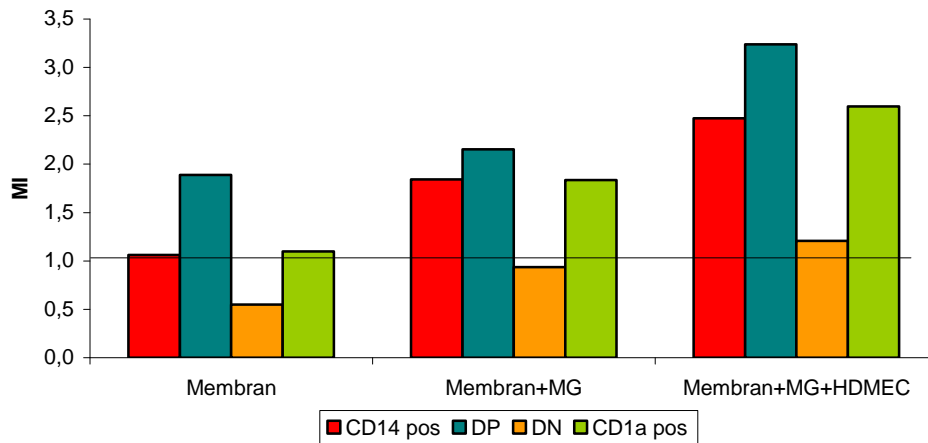


Abb 3.2.4. Migration von CD34DC durch unbeschichtete und beschichtete Transwell-Membran auf KCM hinein

1×10^6 CD34DC (an d7) wurden in die obere Kammer eines Transwell überführt. Die Transwell-Membran blieb ohne Beschichtung oder wurde zuvor mit Matrigel™(MG) oder noch zusätzlich mit Endothelzellen (HDMEC) beschichtet. In der unteren Kammer des Transwell war Keratinozyten-konditioniertes Medium als Chemoattraktans. Nach 4h wurden die migrierten Zellen gezählt und mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der migratorische Index (MI) der einzelnen CD34DC Subpopulationen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Die Rolle der Endothelzellen wurde auch für die Migration von Monozyten untersucht.

Die Bedingungen auf der Transwell-Membran waren die gleichen wie oben für die Migration der CD34DC beschrieben. In der unteren Transwell-Kammer befand sich jedoch konditioniertes Medium von Fibroblasten (FCM). Die unterschiedlichen Chemoattraktantien wurden entsprechend der *in vivo* Situation ausgewählt. Monozyten werden im Blut transportiert und werden zunächst mit Faktoren konfrontiert, die von Fibroblasten sezerniert werden. In Abb.3.2.5 ist der MI der CD14_{high} und CD14_{low} Monozyten dargestellt. Anders als bei den CD34DC nahm die spezifische Migration bei der Beschichtung der Transwell-Membran mit Matrigel und Endothelzellen ab. Zwischen dem spezifischen Migrationsverhalten der CD14_{low} und CD14_{high} Population konnte kaum ein Unterschied festgestellt werden. In dem in Abb.3.2.4 gezeigten Experiment migrierte die CD14_{high} Population ein wenig stärker.

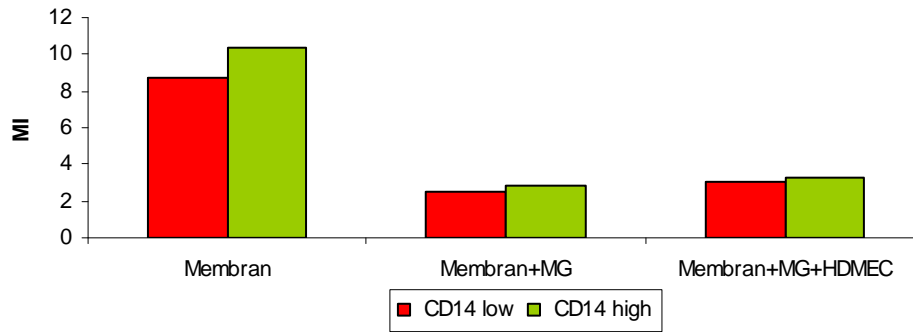


Abb.3.2.5 Migration von Monozyten durch unbeschichtete und beschichtete Transwell-Membran in FCM hinein

1×10^6 Monozyten wurden in die obere Kammer eines Transwell gegeben. Die Transwell-Membran blieb ohne Beschichtung, oder wurde zuvor mit Matrigel™(MG) oder noch zusätzlich mit Endothelzellen (HDMEC) beschichtet. In der unteren Kammer des Transwells war Fibroblasten-konditioniertes Medium als Chemoattraktans. Nach 4h wurden die migrierten Zellen gezählt und mit einem spezifischen Antikörper gegen CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der migratorische Index (MI) der beiden Monozytenpopulation. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n=2.

Interessanterweise verlief nicht nur die spezifische Migration der Monozyten anders als bei den CD34DC beschrieben, sondern auch die spontane Migration in das Kontrollmedium zeigte ein anderes Muster. Anders als bei den CD34DC nahm die spontane Migration mit zunehmender Beschichtung auf der Transwell-Membran zu (Abb.3.2.6). Vor allem die CD14_{high} Zellen zeigten ein solches Muster. Bei den CD14_{low} Monozyten konnte diese Tendenz nicht beobachtet werden.

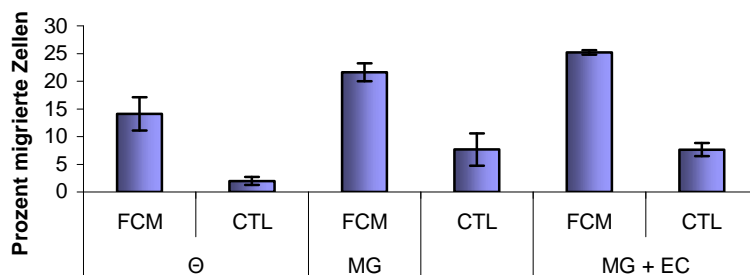


Abb.3.2.6 Migration von Monozyten durch beschichtete und unbeschichtete Transwell-Membran in FCM (Prozent migrierte Zellen)

1×10^6 frisch isolierte Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwells gegeben. Die Transwell-Membran blieb ohne Beschichtung (Θ), oder wurde zuvor mit Matrigel™(MG) oder noch zusätzlich mit Endothelzellen (MG+EC) beschichtet. In der unteren Kammer war entweder Fibroblasten-konditioniertes Medium (FCM) oder das Kontrollmedium (CTL). Alle Zellen, die nach 4h in der unteren Kammer gezählt wurden, wurden mit einem spezifischen CD14 Antikörper gefärbt und immunzytologisch analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert von Duplikaten +/- SD. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis für n=2.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Endothelzellen auf die Migration von CD34DC und Monozyten zeigte sich, dass die spezifische Migration der CD34DC in KCM durch die

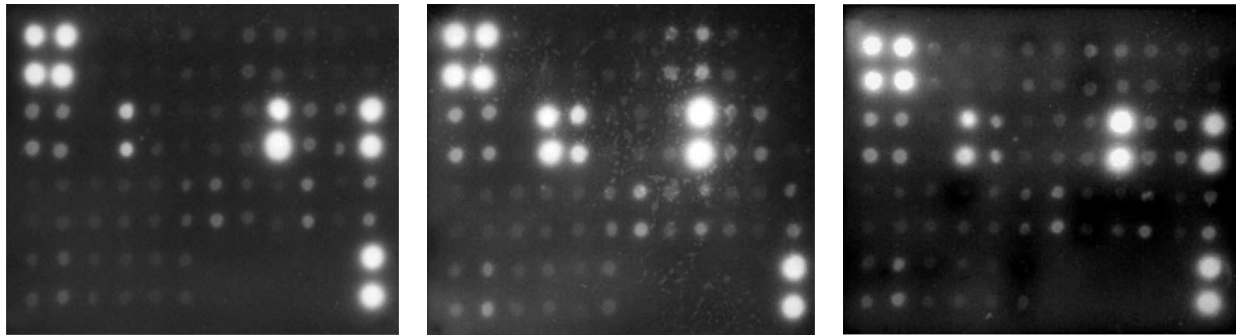
Beschichtung der Transwell-Membran mit Matrigel™ oder zusätzlich noch mit Endothelzellen zunahm. Anders dagegen war die Migration der Monozyten in FCM hinein, hier nahm die spontane Migration durch Beschichtung der Membran mit Matrigel™ oder Endothelzellen zu.

Um zu untersuchen, ob Endothelzellen nicht nur Wirkung auf die Vorläuferzellen durch den interzellulären Kontakt haben, sondern ebenfalls Einfluss auf die Vorläuferzellen durch in das Blut sezernierte Chemoattraktantien ausüben können, wurde die transendotheliale Migration von CD34DC in konditioniertes Medium von Endothelzellen (EnCM) untersucht (nicht gezeigt). Die Migration der CD34DC wurde spezifisch durch das konditionierte Medium (EnCM) verstärkt.

3.2.3 Chemokine in den konditionierten Medien

Da EnCM, FCM und KCM die spontane Migration der Vorläuferzellen spezifisch verstärkten, sollte im nächsten Schritt die Frage nach den dafür verantwortlichen Faktoren geklärt werden. Dafür wurden die Medien auf chemoattraktive Substanzen untersucht. Um eine möglichst weit gefasste Analyse zu erhalten, wurde ein Chemokin-Array Test durchgeführt, in dem 38 Chemokine nachgewiesen werden konnten. Mit diesem Test konnten die Chemokine nur qualitativ nachgewiesen werden, eine quantitative Auswertung war nicht möglich.

Abb.3.2.7 zeigt die Membranen, auf denen die jeweiligen Antikörper gegen die Chemokine fixiert waren. Die spezifische Bindung der Chemokine an diese Antikörper wurde mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Chemokin-spezifischen Antikörpers mit einem spezifischen Substrat nachgewiesen (Siehe 2.5.3). Die bei der Peroxidase-Reaktion entstehende Chemolumineszens wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms festgehalten. Mit Hilfe digitaler densitometrischer Analysen wurden die Belichtungen ausgewertet. Durch die Berechnung der Intensität der Belichtung der Negativkontrollen wurde zwischen positiven und negativen Signalen unterschieden. Ein Signal wurde als positiv definiert, wenn sein Wert doppelt so hoch war wie die Negativkontrolle (siehe im Anhang Tabelle III). In Tabelle 2.3.1 ist die Beschichtung der Membranen aufgetragen.



FCM

KCM

EnCM

Abb.3.2.7 Chemokine in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten

Mit Hilfe eines Chemokin-Array Tests konnten in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten 38 Chemokine nachgewiesen werden. Dargestellt sind die belichteten Röntgenfilme, die der densitometrischen Analyse zu Grunde lagen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=2.

POS	POS	NEG	NEG	BLC	CCL28	Ckβ8-1	CTACK	CXCL16	ENA-78	Eotaxin	Eotaxin-2
POS	POS	NEG	NEG	BLC	CCL28	Ckβ8-1	CTACK	CXCL16	ENA-78	Eotaxin	Eotaxin-2
Eotaxin-3	Fractalkine	GCP-2	GRO	GROα	HCC-4	I-309	I-TAC	IL-8	IP-10	Lymphotactin	MCP-1
Eotaxin-3	Fractalkine	GCP-2	GRO	GROα	HCC-4	I-309	I-TAC	IL-8	IP-10	Lymphotactin	MCP-1
MCP-2	MCP-3	MCP-4	MDC	MIG	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1δ	MIP-3α	MIP-3β	MIPF-1	NAP 2
MCP-2	MCP-3	MCP-4	MDC	MIG	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1δ	MIP-3α	MIP-3β	MIPF-1	NAP 2
PARC	RANTES	SDF-1α	SDF-1β	TARC	TECK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
PARC	RANTES	SDF-1α	SDF-1β	TARC	TECK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

Tabelle 3.2.1. Beschichtung der Membran des Chemokin-Array Tests

Die Mehrzahl der Chemokine wurde von allen drei Zelltypen sezerniert, jedoch konnten einige Chemokine spezifisch für einzelne Zelltypen nachgewiesen werden. In Abb.3.2.8 ist das Ergebnis des Chemokin-Tests als Diagramm aufgezeichnet. Die Schnittmengen zeigen die Chemokine, die in zwei oder drei Medien nachgewiesen werden konnten.

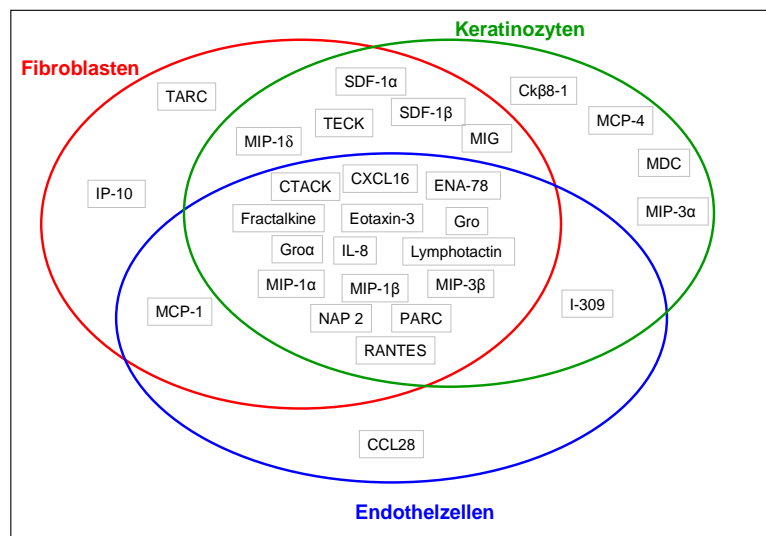


Abb.3.2.8 Chemokine in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten

Dargestellt sind die Chemokine, die in den jeweiligen Medien nachgewiesen werden konnten. Ein Signal wurde als positiv definiert, wenn sein Wert doppelt so hoch war wie die Negativkontrolle. In den Schnittmengen sind die Chemokine gezeigt, die in mehreren Medien nachgewiesen werden konnten.

Endothelzellen sezernierten nur CCL28 (MEC) als spezifisches Chemokin. Keratinozyten sezernierten spezifisch die Chemokine MCP-4 (CCL13), MDC (CCL22), Ck β 8-1 (CCL23) und MIP-3 α (CCL20). Als Fibroblasten-spezifische Chemokine wurden TARC (CCL17) und IP-10 (CXCL10) nachgewiesen. Dass die meisten Chemokine von allen Zellen gleichermaßen sezerniert wurden, zeigt zum einen die wichtige Rolle dieser Faktoren bei der Immigration von Zellen in die Gewebe. Zum anderen zeigen die wenigen zellspezifischen Chemokine, dass diese Faktoren auch selektive Funktionen ausüben könnten.

In den folgenden Untersuchungen sollte die Wirkung eines Teils dieser zellspezifischen Faktoren auf die Immigration von Vorläuferzellen im Einzelnen untersucht werden, wobei besonders die Wirkung von MCP-1, MCP-4 und MIP-3 α untersucht werden sollte, da sie möglicherweise bei der Immigration eine relevante Funktion ausüben. Tabelle 3.2.2 zeigt die jeweiligen Chemokinrezeptoren dieser Chemokine.

Chemokin	Trivialname	Rezeptor
CCL2	MCP-1	CCR1, CCR2
CX ₃ CL1	Fractalkine	CX ₃ CXR1
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL20	MIP-3 α	CCR6

Tabelle 3.2.2 Die in den folgenden Versuchen eingesetzten Chemokine und ihre bekannten Rezeptoren.

3.3 Migration und Differenzierung der Vorläuferzellen in der Dermis

Nach Diapedese durch die Endothelzellen gelangen die Langerhans Vorläuferzellen in die Dermis. In diesem Kompartiment befinden sie sich zum einen in dem dermalen Mikromilieu, zum anderen bilden sie intrazelluläre Kontakte mit den dermalen Fibroblasten aus. Diese beiden Faktoren könnten, je nach dem immunologischen Status der Haut, die Vorläuferzellen zur Differenzierung induzieren. In der nicht entzündeten Haut differenzieren die meisten immigrierten Vorläuferzellen zu Makrophagen und dermalen DC (Larregina et al., 2001). Nur der kleinste Teil der Vorläuferzellen wird möglicherweise induziert, in die Epidermis einzuwandern, um dort zu Langerhans Zellen zu differenzieren.

In diesem Teil der Arbeit sollte die Rolle der Fibroblasten bei der Differenzierung der immigrierten Vorläuferzellen zu DC untersucht werden. Hierfür wurde konditioniertes Medium von proliferierenden Fibroblasten in Transwell-Migrations-Experimenten als Chemoattraktans für die unterschiedlichen Vorläuferzellen eingesetzt. Neben der Untersuchung möglicher Chemoattraktantien in FCM wurden die Vorläuferzellen, die in

FCM migriert waren, darin weiterkultiviert, um das konditionierte Medium auf mögliche Faktoren zu untersuchen, die zur Differenzierung der Vorläuferzellen führen könnten.

3.3.1 Migration von CD34DC auf dermale Faktoren hin

Zunächst wurde die Migration von CD34DC in das dermale Kompartiment untersucht.

Um den Einfluss des Mikromilieus in der Dermis zu untersuchen, wurde konditioniertes Medium von Fibroblasten (FCM) gewonnen und in der unteren Kammer des Transwell als Chemoattraktans für CD34DC eingesetzt. Die Transwell-Membran war in diesen Versuchen mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet. Nach vier Stunden wurden die migrierten CD34DC gezählt und immunzytometrisch analysiert. Die Anzahl spezifisch in FCM migrierter CD34DC schwankte in den Experimenten sehr stark. Dennoch konnte beobachtet werden, dass innerhalb der CD34DC die CD14_{pos} Zellen am stärksten in das FCM migrierten. Die spontane Migration der anderen Subpopulationen (CTL) wurde durch FCM nur leicht verstärkt (Abb.3.3.1).

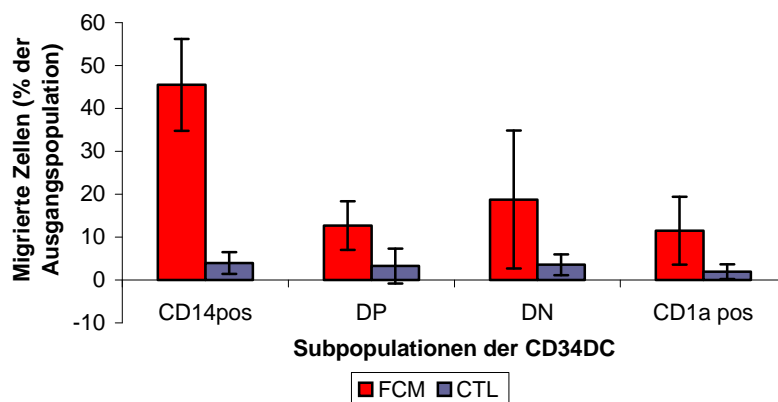


Abb.3.3.1 Migration von CD34DC auf Fibroblasten-konditioniertes Medium (FCM) hin
 CD34DC wurden an d7 auf die mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran gegeben. In der unteren Kammer war als chemoattraktiver Stoff FCM oder als Kontrolle das unkonditionierte Fibroblasten-Medium (CTL). Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt und mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die migrierten Subpopulationen als prozentuale Verteilung im Bezug zu den Ausgangspopulationen. Dargestellt ist der Mittelwert von n=3 +/- SD

MCP-1 war eines der Chemokine, das in dem konditionierten Medium von Fibroblasten und Endothelzellen mit Hilfe des Chemokin-Array Tests nachgewiesen wurde. Nachdem MCP-1 schon als starkes Chemoattraktans für Monozyten bekannt ist (Fantuzzi et al., 1999), wurde die chemoattraktive Wirkung von rekombinatem MCP-1 auf CD34DC untersucht. Daneben wurde ein anti-MCP-1 Antikörper eingesetzt, der die Wirkung von MCP-1 neutralisieren sollte. Vor Migration wurde der anti-MCP-1 Antikörper zusammen mit dem rekombinanten

MCP-1 für 30 min. inkubiert, bevor die CD34DC in die obere Transwell-Kammer überführt wurden.

Ebenso wie in das FCM migrierte die CD14_{pos} Subpopulation am stärksten spezifisch auf das rekombinante MCP-1 zu. Die drei anderen Subpopulationen migrierten nur wenig stärker auf MCP-1 hin als auf die Mediumkontrolle. Die Zugabe des spezifischen anti-MCP-1 Antikörpers wirkte sich am stärksten auf die spezifische Migration der CD14_{pos} Subpopulation aus. Die Migration der CD1a_{pos} Zellen wurde durch die Zugabe des Antikörpers am geringsten beeinflusst (Abb.3.3.2).

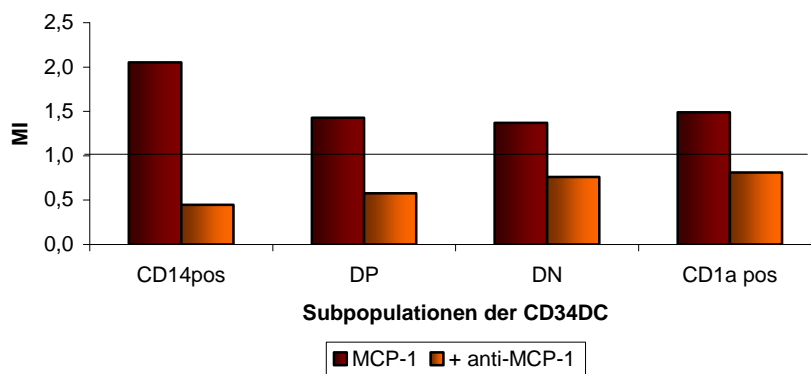


Abb.3.3.2 Migration von CD34DC auf MCP-1 hin; Inhibition durch einen anti-MCP-1 Antikörper

Die chemoattraktive Wirkung von humanem rekombinanten MCP-1 (10 ng/ml) wurde auf CD34DC untersucht. Hierfür wurden 1×10^6 CD34DC in die obere Kammer des Transwells gegeben, in der unteren Kammer befand sich die MCP-1 Lösung. Optional wurde vor dem Beginn der Migration zu der MCP-1 Lösung ein spezifischer anti-MCP-1 Antikörper (0,5 µg/ml) hinzugegeben. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt, mit spezifischen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der MI der vier Subpopulationen eines repräsentativen Ergebnisses von n=6.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CD34DC spezifisch in FCM hinein und auf MCP-1 hin migrierten, wurde als nächstes die Rolle von MCP-1 in dem FCM untersucht. Hierfür wurde vor Beginn der Migration das FCM 30 min. mit dem spezifischen anti-MCP-1 Antikörper inkubiert, bevor die CD34DC in die obere Kammer überführt wurden. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt und immunzytometrisch analysiert. Wie schon in Abb.3.3.1 gezeigt, migrierten alle Subpopulationen spezifisch in das FCM. Der spezifische anti-MCP-1 Antikörper inhibierte die Migration aller Subpopulationen, wobei die Migration der CD14 exprimierenden Subpopulationen ein wenig stärker inhibiert wurde (Abb.3.3.3).

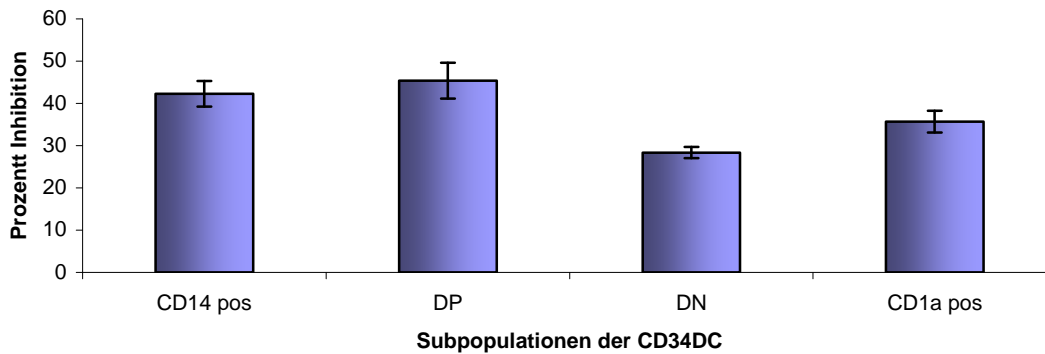


Abb.3.3.3 Inhibition der spezifischen Migration von CD34DC in FCM hinein durch einen anti-MCP-1 Antikörper

Der anti-MCP-1 Antikörper (0,5 µg/ml) wurde vor Beginn der Migration zu dem FCM gegeben. 1×10^6 CD34DC wurden in die obere Transwell-Kammer gegeben und nach vier Stunden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt. Die migrierten Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgetragen ist die Inhibition der spezifischen Migration der einzelnen Subpopulationen. Gezeigt ist der Mittelwert von $n=2$ (+/- SD).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass von MCP-1 ein Teil der chemoattraktiven Wirkung von FCM auf CD34DC abgeleitet werden kann. Um die Wirkweise von MCP-1 genauer zu untersuchen, wurden die Zellen vor und nach Migration auf die Expression von CCR1 und CCR2 durchflusszytometrisch untersucht. Diese beiden Chemokinrezeptoren sind die spezifischen Rezeptoren für MCP-1; sie konnten, wie schon in Abschnitt 3.1. beschrieben, nur in geringer Dichte mit immunzytometrischen Methoden auf der Oberfläche der CD34DC nachgewiesen werden. Es konnte kein migrationsspezifischer Effekt auf die Expression von CCR1 und CCR2 in der FACS-Analyse gezeigt werden, die CD14_{pos} Zellen waren auch nach Migration die einzigen CD34DC, die CCR2 exprimierten. CCR1 konnte auch nach Migration nicht auf den CD34DC nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um mit einer zweiten Methode diesen Befund genauer zu analysieren, wurde mRNA aus den migrierten CD34DC aufgereinigt, um mit spezifischen Oligonukleotiden die Gen-Expression von CCR1 und CCR2 nachzuweisen. Auch mit dieser zweiten Analysemethode konnten keine Effekte auf die Expression von CCR1 und CCR2, hervorgerufen durch die Migration in FCM oder auf MCP-1 hin, gefunden werden (nicht gezeigt).

Die Experimente zur Migration der CD34DC in das dermale Milieu zeigten, dass bevorzugt die CD14-exprimierenden CD34DC auf Faktoren reagierten, die von Fibroblasten sezerniert wurden. Als einer dieser Faktoren konnte MCP-1 identifiziert werden, da ein spezifischer anti-MCP-1 Antikörper die gezielte Migration von CD34DC inhibieren konnte. Über die

Funktion der Chemokinrezeptoren kann durch diese Experimente keine eindeutige Aussage gemacht werden, da nur die CD14-positive Subpopulation den hochaffinen Rezeptor für MCP-1, CCR2, exprimierten, und sich dies auch nach Migration in FCM oder auf MCP-1 hin nicht änderte.

3.3.2 Sequenzielle Migration von Monozyten auf Faktoren dermalen Zellkompartimente hin

Monozyten stammen von den CD34_{pos} hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab, sie können sowohl zu DC als auch zu Makrophagen differenzieren. Da die Monozyten aus dem peripheren Blut aufgereinigt wurden und ohne vorherige Kultivierung in den Migrations-Experimenten eingesetzt wurden, sind Differenzierungen von Monozyten sehr aussagekräftig, da sie sehr nahe an der *in vivo* Situation einzuordnen sind. Die Monozyten in diesen Experimenten wurden aus Leukozytenkonzentraten aufgereinigt, die vor der Aufreinigung ca. 20h kühl gelagert wurden. Die Aufreinigung der Monozyten erfolgte, wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben, mit Hilfe des MACS-Systems.

Um die Frage zu klären, in wie weit sich Faktoren der unterschiedlichen Kompartimente der Haut auf die Migration und die Differenzierung von Monozyten auswirken, wurde ein Migrations-Modell entwickelt, das aus zwei aufeinander folgenden Migrationsschritten bestand. Die erste Migration sollte der Immigration in die Dermis, gekoppelt mit Diapedese durch die Endothelzellschicht, entsprechen, gefolgt von der zweiten Migration, der Immigration in die Epidermis unter Berücksichtigung des Kontaktes mit der Basalmembran.

Der Versuchsaufbau (siehe Abb.3.3.4) der sequenziellen Migration leitete sich aus dem Weg der Vorläuferzellen vom Blut bis in die Epidermis ab. Die Zellen sollten zunächst an den Endothelzellen adhären. Nach der transendothelialen Migration befinden sich die Zellen in dem dermalen Milieu, in dem sie Faktoren ausgesetzt sind, die von den Fibroblasten abstammen. Die Migration der Zellen in das epidermale Kompartiment sollte durch eine zweite Migration in KCM simuliert werden. In diesem Schritt war die Transwell-Membran nur mit MatrigelTM und nicht noch zusätzlich mit Endothelzellen beschichtet, da zwischen der Dermis und der Epidermis nur noch die Basalmembran der Keratinozyten ist.

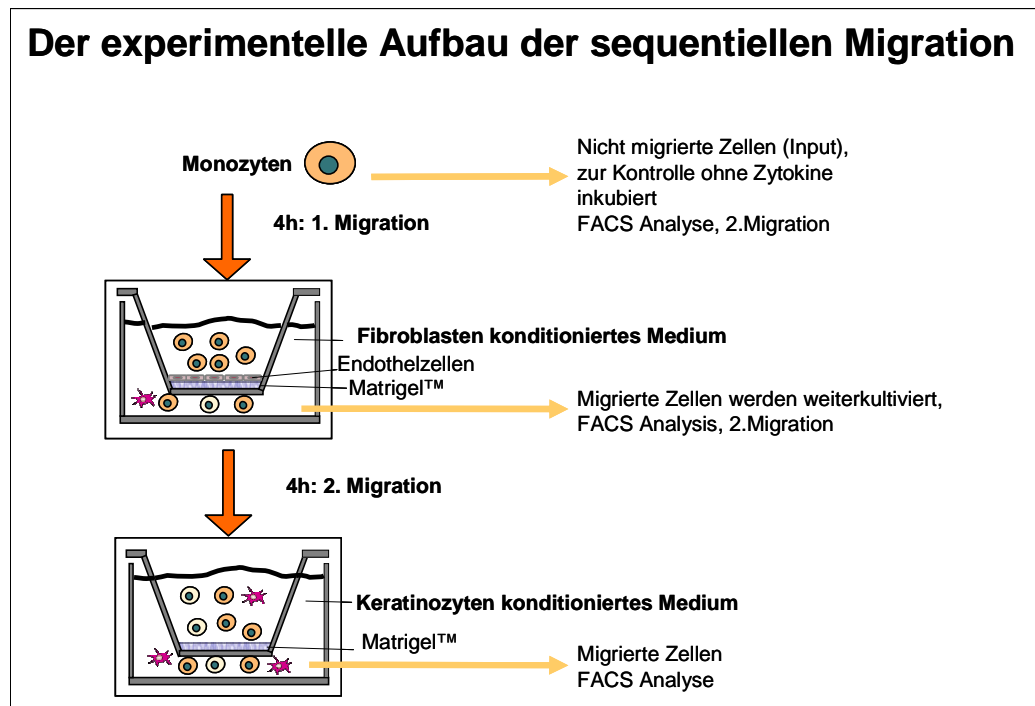


Abb.3.3.4 Schema des experimentellen Aufbaus der sequenziellen Migration der Monozyten

Entsprechend des Schemas in Abb.3.3.4 wurden die Zellen, die während der ersten Migration durch Matrigel™ und Endothelzellschicht in FCM migriert waren, für 18h in dem FCM inkubiert. Dieser Zeitraum sollte das Verbleiben der Vorläuferzellen in der Dermis simulieren. Zur Kontrolle wurden Monozyten ohne vorherige Migration in normalem Monozyten-Medium (VLE-Medium) ohne Zytokine kultiviert. Unter beiden Bedingungen kultivierte Zellen wurden phänotypisch mit FACS-Analyse charakterisiert. Die anschließende zweite Migration sollte die Einwanderung der Vorläuferzellen in die Epidermis simulieren. Dabei wurden die zuvor migrierten Zellen und die zuvor nicht migrierten Zellen auf die nur mit Matrigel™ beschichtete Transwell-Membran gegeben. In der unteren Transwell-Kammer war Keratinozyten-konditioniertes Medium (KCM) als Chemoattraktans. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und immunzytometrisch analysiert.

In Abb.3.3.5 ist das Ergebnis der sequenziellen Migration gezeigt, wobei jeder Migrationschritt als ein Balkendiagramm aufgetragen ist. Die frisch aufgereinigten Monozyten migrierten stark spezifisch durch Matrigel™ und die Endothelzellschicht in das FCM (orange Balken) hinein (siehe auch Abb.3.2.5 und 3.2.6). In der zweiten Migration migrierten nur die Zellen spezifisch durch Matrigel™ in das KCM, die zuvor in das FCM hinein migriert waren, und für 18h in FCM kultiviert wurden. Monozyten, die parallel in normalem Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert worden waren, zeigten keine spezifische Antwort auf das KCM (blaue Balken).

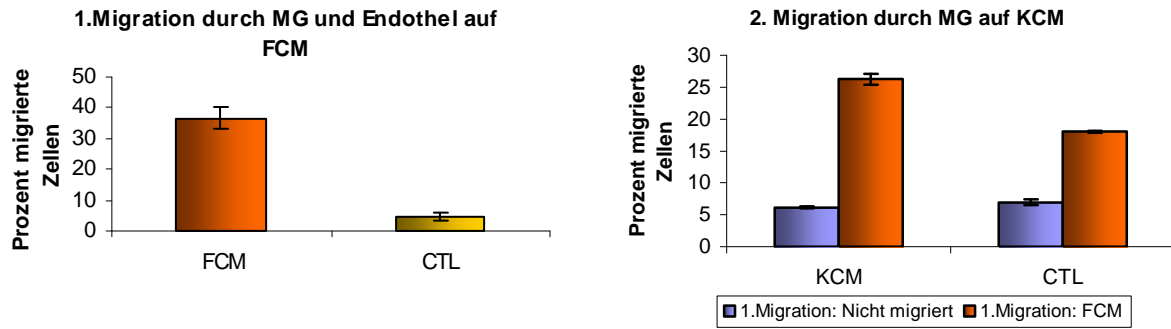


Abb.3.3.5 Sequenzielle Migration von Monozyten

1×10^6 Monozyten wurden in die obere Transwell-Kammer gegeben, deren Membran wurde zuvor mit Matrigel™(MG) und Endothelzellen beschichtet. In der unteren Kammer war entweder FCM als Chemoattraktans oder das Kontrollmedium (CTL). Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und anschließend für 18h weiterkultiviert. In dem zweiten Diagramm ist das Ergebnis der zweiten Migration dargestellt, in der die Monozyten, die zuvor nur kultiviert wurden (blaue Balken) oder Monozyten, die zuvor in FCM hinein migriert waren (orange Balken), auf die mit Matrigel beschichtete Transwell-Membran gegeben wurden. In der unteren Kammer war als Chemoattraktans KCM oder CTL. Die nach vier Stunden migrierten Zellen wurden gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten (+/-SD) eines repräsentativen Ergebnisses von n=4.

Dieses Ergebnis war der erste funktionelle Hinweis auf die induzierte Differenzierung der Monozyten durch Migration mit anschließender Kultivierung. Durch phänotypische Analyse der Monozyten nach Aufreinigung (Input), nach der ersten Migration, den 18h Kultivierung und der zweiten Migration in KCM sollte die Differenzierung genauer untersucht werden.

Zunächst wurde die Expression der relevanten Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche analysiert, wobei hier hauptsächlich auf die Expression von CCR1 und CCR2 eingegangen wird. Diese beiden Rezeptoren binden unter anderem MCP-1, das in dem FCM nachgewiesen wurde (Abb.3.2.8) und das eine wichtige Rolle bei der Immigration von DC Vorläuferzellen in die Dermis spielt.

Abb.3.3.6 zeigt die Expression von CCR1 auf den CD14_{high} und CD14_{low} Monozytenpopulationen. Wie schon in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurde CCR1 stärker von den CD14_{high} Monozyten exprimiert. Jedoch war die Expression auf den Monozyten, die durch die magnetische Sortierung aufgereinigt wurden, in den meisten Experimenten niedriger als auf den Monozyten, die nur mit Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt wurden (nicht gezeigt). Nach Migration und Kultivierung (rote und orange Balken) oder nur Kultivierung ohne vorherige Migration (grüne Balken) war die Expression von CCR1 auf den Zellen stärker als direkt nach der Aufreinigung (blaue Balken) (Abb.3.3.6). Die CD14_{low} Zellen waren nach 18h bis zu 50% CCR1 positiv (oberes Diagramm Abb.3.3.6), hingegen exprimierten alle CD14_{high} Zellen CCR1 (unteres Diagramm Abb.3.3.6). Nach der zweiten Migration durch Matrigel™ in das KCM nahm die Expression von CCR1 auf den CD14_{low}

Zellen wieder ab, dagegen blieb die Expression auf den CD14_{high} Zellen konstant, wenn sie zuvor in KCM migriert waren (rote Balken) Die Zellen, die zuvor nicht migriert waren, regulierten die Expression von CCR1 nach der Migration in KCM herunter (grüne Balken). Die CCR1-Expression wurde durch Migration oder Kultivierung ohne Zytokine auf den Zellen verstärkt. Wurden die Monozyten dagegen mit IL-4 und GM-CSF in Kultur genommen, nahm die Expression von CCR1 mit der Differenzierung zu DC ab (Abb.3.1.6).

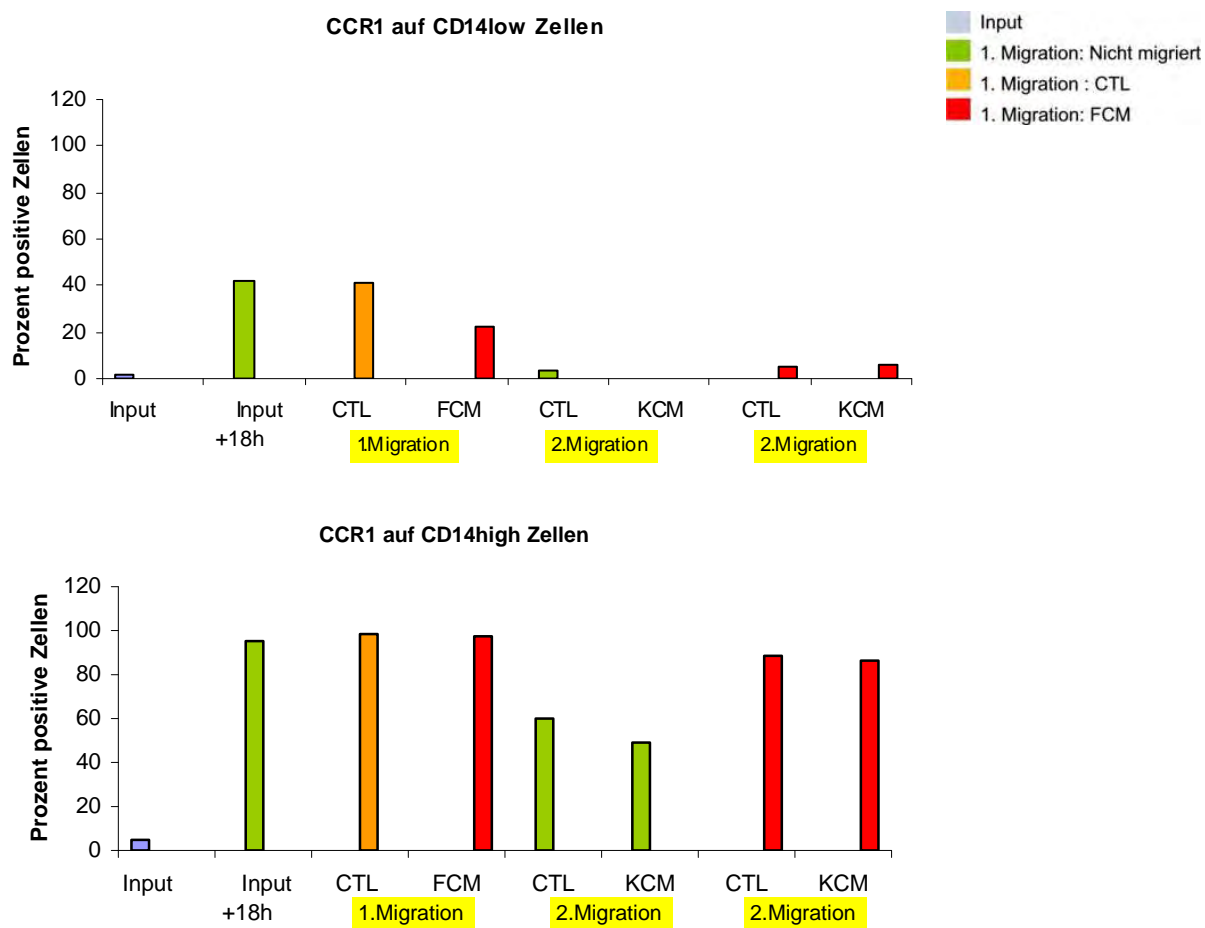


Abb.3.3.6 CCR1-Expression auf CD14_{low} und CD14_{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration

Frisch isolierte Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Membran wurde zuvor mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtet, in der unteren Kammer war als Chemoattraktans FCM oder CTL. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und für 18h weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden Monozyten nach der Isolierung in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert. Vor der zweiten Migration wurde ein Teil der Zellen auf die Expression von CCR1 immunzytometrisch analysiert. In der zweiten Migration war die Transwell-Membran nur mit MatrigelTM beschichtet, in der unteren Kammer befand sich KCM oder CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden Migration wurden die Zellen in der unteren Kammer auf ihre Expression von CCR1 immunzytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3.

Als weiterer Chemokinrezeptor wurde die Expression von CCR2 auf den Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration untersucht. CCR2 wurde auf CD14_{low} Monozyten nur

minimal exprimiert (Abb.3.3.7). Nach 18h war die CCR2-Expression leicht auf den CD14_{low} Zellen verstärkt, unabhängig von den vorangegangenen Bedingungen. In allen Experimenten exprimierten die CD14_{high} Monozyten nach Migration in FCM noch konstant CCR2 (roter Balken) (Abb.3.3.7).

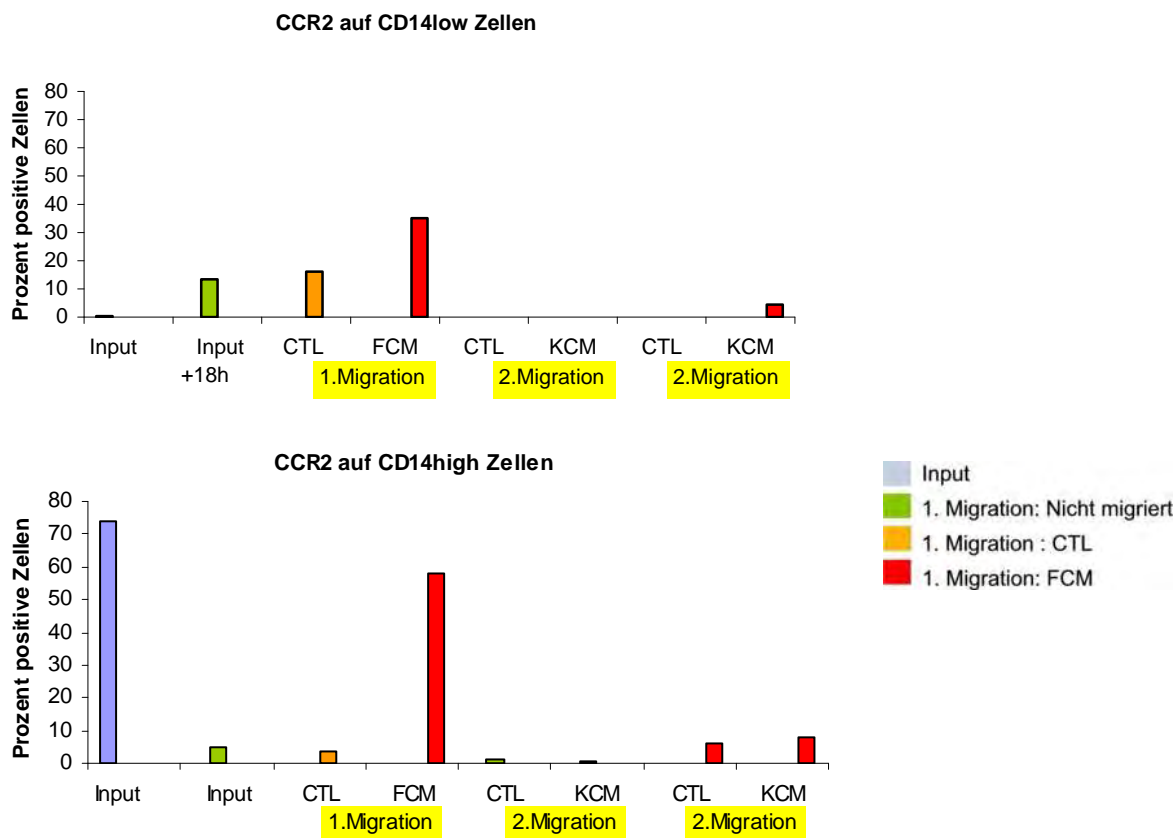


Abb.3.3.7 CCR2-Expression auf CD14_{low} und CD14_{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration

Frisch isolierte Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Membran wurde zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet, in der unteren Kammer war als Chemoattraktans FCM oder CTL. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und für 18h weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden Monozyten nach der Isolierung in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert. Vor der zweiten Migration wurde ein Teil der Zellen auf die Expression von CCR2 immunzytometrisch analysiert. In der zweiten Migration war die Transwell-Membran nur mit Matrigel™ beschichtet und in der unteren Kammer befand sich KCM oder CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden Migration wurden die Zellen in der unteren Kammer auf ihre Expression von CCR2 immunzytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3.

Die Monozyten, die nicht migriert waren (grüner Balken) oder in das Kontrollmedium (CTL) migriert waren (orange Balken), exprimierten deutlich weniger CCR2 auf der Zelloberfläche. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass durch die spezifische Migration in FCM und die anschließende Kultivierung in FCM die CD14_{high} Zellen induziert wurden, CCR2

konstant auf der Oberfläche zu exprimieren. Dagegen führte die Kultivierung ohne vorherige Migration zum Verlust des CCR2 Rezeptors auf der Zelloberfläche, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen im Monozyten-Medium mit Zytokinen (Abb.3.1.6) oder ohne Zytokine (Abb.3.3.7). Nach der zweiten Migration in KCM hinein wurde CCR2 nur noch gering auf den Zellen exprimiert, die zuvor in das FCM migriert waren. Diese Expression war unabhängig von dem Medium, das in der unteren Transwell-Kammer war (Abb.3.3.7).

Ein weiterer Hinweis für die Stabilisierung von CCR2 auf der Zelloberfläche der spezifisch in das FCM migrierten Monozyten wurde in dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Experiment gewonnen. In diesem Versuchsansatz sollte die Funktion der Endothelzellen bei der gezielten Migration auf FCM hin untersucht werden. Monozyten wurden dafür entweder auf unbeschichtete, mit Matrigel™ oder Matrigel™ plus Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran gegeben. Wie in Abb.3.2.6 zu sehen, nahm die spontane Migration der Monozyten durch die Beschichtung der Transwell-Membran mit Matrigel™ oder Endothelzellen zu. Ebenso korrelierte die Stabilisierung der CCR2 Moleküle auf der Oberfläche der spezifisch migrierten CD14_{high} Zellen mit der Beschichtung der Transwell (Abb.3.3.8). War die Membran mit Endothelzellen und Matrigel™ beschichtet, blieb die Expression von CCR2 unverändert.

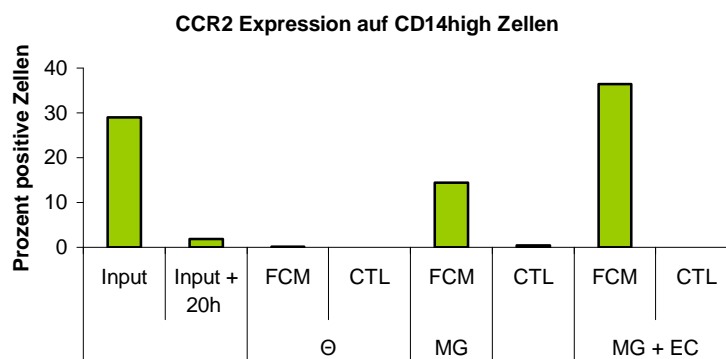


Abb.3.3.8 CCR2-Expression auf CD14_{high} Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen auf FCM hin

Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Membran blieb unbeschichtet (Θ) oder wurde zuvor entweder mit Matrigel™ (MG) oder mit MG und Endothelzellen (MG+EC) beschichtet. In der unteren Kammer befand sich FCM bzw. CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt und nach 18h Kultivierung immunzytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Monozyten nach Isolierung (Input) in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert (Input + 20h). Analysiert wurde die CCR2-Expression auf den CD14_{high} Zellen.

Aus diesen beiden Experimenten kann gefolgert werden, dass CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Monozyten durch Migration durch Matrigel™ und die Endothelzellschicht in FCM hinein und anschließender Kultivierung in FCM stabilisiert wird, wohingegen spontan

migrierte Monozyten sowie nicht migrierte Zellen CCR2 nicht mehr auf der Oberfläche exprimierten.

Als weitere Chemokinrezeptoren wurde die Expression von CCR3 und CX₃CR1 auf den Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration untersucht, da von deren Liganden ebenfalls vermutet wird, eine Rolle bei der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen zu spielen. CCR3 ist unter anderen der Rezeptor für MCP-4, das nur in KCM nachgewiesen wurde (Abb.3.2.8). Es sollte untersucht werden, ob durch Migration in FCM die Monozyten induziert werden, die besonders für die Immigration in die Epidermis wichtigen Rezeptoren, wie möglicherweise CCR3, stärker zu exprimieren. CX₃CR1 ist der spezifische Rezeptor für Fractalkine, das in allen untersuchten Medien nachgewiesen wurde (Abb.3.2.8). Da CX₃CR1 besonders auf CD16_{high}CD14_{low} Monozyten exprimiert wurde (Abb.3.1.3), sollte die Wirkung der sequenziellen Migration auf diese Subpopulation untersucht werden.

Für CCR3 konnte kein eindeutiges Ergebnis festgestellt werden. Die Expression von CCR3 war auf den Monozyten sehr heterogen; konstant war dagegen, dass in FCM migrierte und kultivierte CD14_{high} Zellen geringfügig mehr CCR3 auf der Oberfläche exprimierten als Zellen die spontan migriert waren oder die nur inkubiert wurden (siehe Tabelle IV im Anhang). Auf den CD14_{low} Zellen war CCR3 nur sehr gering exprimiert, durch die Kultur unter unterschiedlichen Bedingungen blieb die Expression von CCR3 unverändert.

Ebenso heterogen war das Ergebnis der FACS-Analyse der CX₃CR1 Expression auf den Monozyten. Die prozentuale Verteilung der CX₃CR1 positiven Zellen schwankte je nach Spender sehr stark, teilweise konnte kein CX₃CR1 auf den Monozyten nachgewiesen werden. Es konnte kein eindeutiges Ergebnis durch die Beeinflussung durch Migration oder Kultivierung gewonnen werden (siehe Tabelle IV im Anhang).

3.3.3 Differenzierung der migrierten Monozyten im dermalen Kompartiment

Neben der Analyse der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Zellen wurden die Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration auch auf die Expression der Differenzierungsmarker CD1a und CD14 untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob Fibroblasten-spezifische Faktoren migrierende Monozyten induzieren können, zu DC zu differenzieren. CD1a wurde dabei als Marker für die DC-Differenzierung eingesetzt.

Es zeigte sich, dass durch Kultivierung der Monozyten in FCM CD14_{low} Zellen induziert wurden, CD1a zu exprimieren (Abb.3.3.9). Dieser FCM spezifische Effekt wurde deutlich verstärkt, wenn die CD14_{low} Monozyten vor der Kultivierung in FCM hinein migriert waren. Alle Monozyten, die unter Kontrollbedingungen kultiviert worden waren, blieben CD1a

negativ, ebenso exprimierten die CD14_{high} Zellen unter keiner der untersuchten Bedingungen CD1a.

Die CD1a-Expression auf den CD14_{low} Zellen wurde durch die zweite Migration in KCM noch verstärkt (nicht gezeigt). Von den in FCM migrierten CD14_{low} Zellen waren nach der zweiten Migration in das Kontrollmedium weiterhin 20% CD1a-positiv, bei den spezifisch in KCM migrierten Zellen exprimierten dagegen bis zu 40% der CD14_{low} Zellen CD1a.

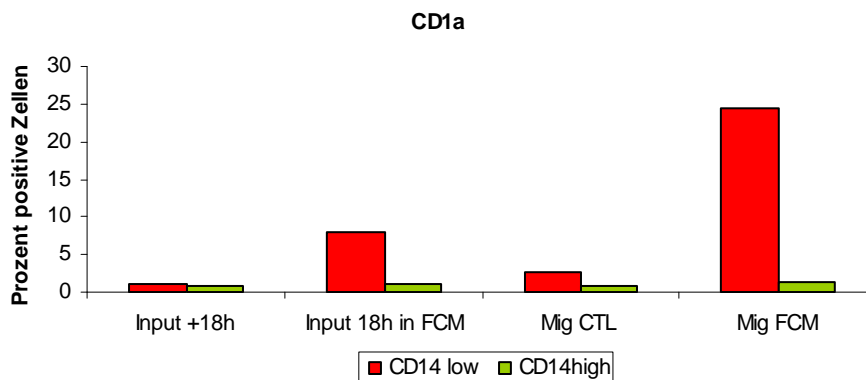


Abb.3.3.9 Induktion der CD1a-Expression auf Monozyten nach transendothelialer Migration in FCM

Frisch aufgereinigte Monozyten wurden in Monozyten-Medium (Input+18h) oder in FCM (Input 18h in FCM) kultiviert. Alternativ wurden Monozyten für 4h in die obere Kammer des Transwell-Systems gegeben und nach vier Stunden die migrierten Zellen in dem Kontrollmedium (Mig CTL) oder in FCM (Mig FCM) für 18h kultiviert. Die kultivierten Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Analysiert sind alle CD14-positiven Zellen, die CD1a exprimierten. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis für n= 6.

In dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Experiment zur Untersuchung der Rolle des Endothels bei der Migration konnte im Zusammenhang mit der Differenzierung der Monozyten eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Die Stärke der CD1a-Expression auf den spezifischen CD14_{low} Zellen nahm durch die Beschichtung mit Matrigel oder Endothelzellen auf der Transwell-Membran ab. Die stärkste CD1a-Expression wurde bei den CD14_{low} Zellen gemessen, die nur durch die unbeschichtete Transwell-Membran migriert waren (Abb.3.3.10).

Die Expression von CD1a auf Zellen, die in FCM kultiviert wurden, ist ein überzeugender Hinweis auf die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DC; diese Wirkung konnte durch vorherige Migration der Monozyten in FCM hinein deutlich verstärkt werden. Diese beiden Beobachtungen geben Anhaltspunkte, dass Fibroblasten in der Dermis durch sezernierte Faktoren und/oder durch direkte Interaktion mit den immigrierten Vorläuferzellen Einfluss auf die spätere Effektorfunktion der Vorläuferzellen nehmen könnten.

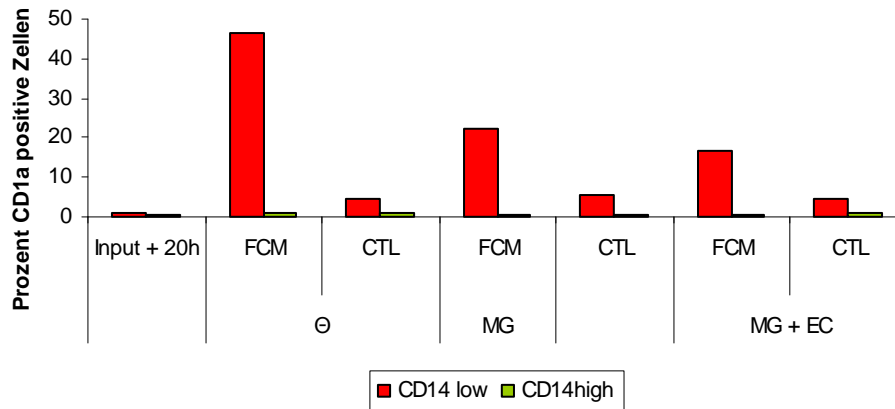


Abb.3.3.10 CD1a-Expression auf CD14 Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen in FCM

Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Transwell-Membran blieb unbeschichtet (\ominus) oder wurde zuvor mit Matrigel™ (MG) oder noch zusätzlich mit Endothelzellen (MG+EC) beschichtet. In der unteren Kammer war FCM als Chemoattraktans oder das Kontrollmedium (CTL). Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt für 20h weiterkultiviert, mit CD14- und CD1a-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden Zellen direkt nach der Aufreinigung (Input) in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert (Input) und phänotypisiert. Analysiert wurden alle CD14-positiven Zellen, die CD1a exprimierten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis für n=2.

Einen weiteren Hinweis auf den selektiven Einfluss von Fibroblasten-spezifischen Faktoren auf die Monozyten ergab die spezifische Oberflächenfärbung des einzigen MIP-3 α Rezeptors CCR6 auf den migrierten Monozyten. MIP-3 α war eines der Chemokine, das nur in KCM nachgewiesen wurde (Abb.3.2.8), es wird entscheidend für die Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis verantwortlich gemacht (Dieu-Nosjean et al., 2000).

Die Expression von CCR6 auf den migrierten Monozyten korrelierte direkt mit der Expression von CD1a. CCR6 wurde ausschließlich auf CD14_{low} Zellen exprimiert, und nur nach Migration und Kultivierung in FCM. Die Migration in FCM hinein verstärkte die Expression von CCR6 deutlich (nicht dargestellt). Eine zweite Migration in KCM hinein beeinflusste die Expression von CCR6 auf den CD14_{low} Zellen nicht mehr, der Prozentanteil positiver Zellen blieb konstant (Abb.3.3.11).

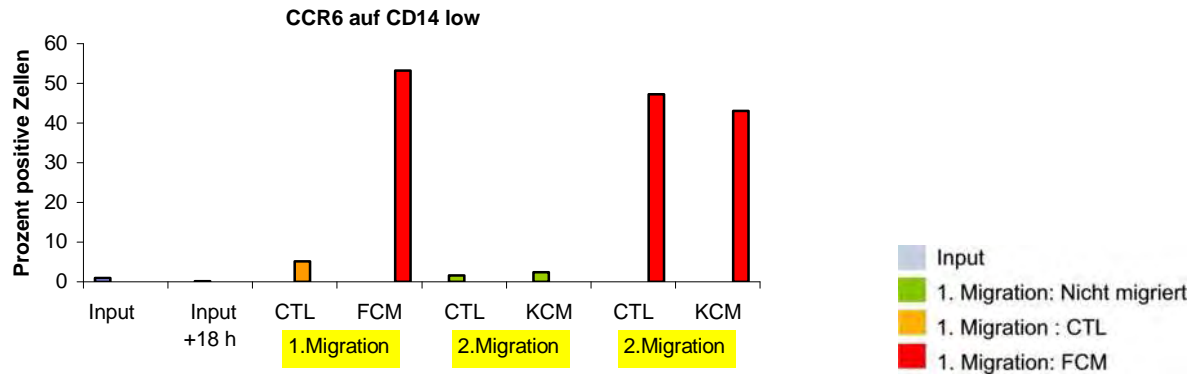


Abb.3.3.11 CCR6-Expression auf CD14_{low} und CD14_{high} Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration

Frisch isolierte Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Membran wurde zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet, in der unteren Kammer war als Chemoattraktans FCM oder CTL. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und für 18h weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden Monozyten nach der Isolierung in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert. Vor der zweiten Migration wurde ein Teil der Zellen auf die Expression von CCR6 immunzytometrisch analysiert. Während der zweiten Migration war die Transwell-Membran nur mit Matrigel™ beschichtet und in der unteren Kammer befand sich KCM oder CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden Migration wurden die Zellen in der unteren Kammer gezählt und die Expression von CCR6 durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4.

Ebenso wie die transendotheliale Migration in FCM hinein Einfluss auf die CCR2-Expression auf den CD14_{high} Monozyten ausübte, konnte auch ein Einfluss der transendothelialen Migration in FCM hinein bei der Expression von CCR6 auf den CD14_{low} Zellen beobachtet werden. Die CD14_{low} Zellen, die spezifisch durch Matrigel™ und die Endothelschicht migriert waren und anschließend in FCM kultiviert wurden, exprimierten am stärksten CCR6 (Abb.3.3.12). Dieses Ergebnis verhielt sich reziprok zu der CD1a-Expression auf den migrierten CD14_{low} Zellen.

Für die Rolle des Endothels bei der Differenzierung von Monozyten zu DC kann zusammengefasst werden, dass durch die transendotheliale Migration mehr CD14_{low} Zellen induziert wurden, CCR6 zu exprimieren. Die Migration verstärkte in allen Experimenten die Wirkung des FCM, CD1a auf den CD14_{low} Zellen zu induzieren.

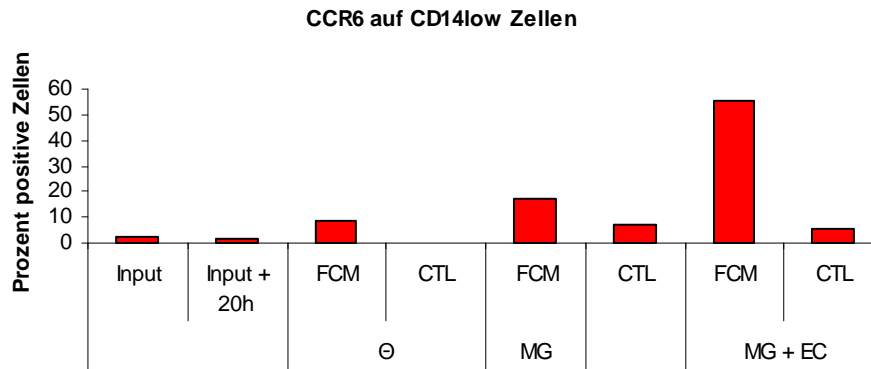


Abb.3.3.12 CCR6-Expression auf CD14_{low} Zellen nach Migration durch unterschiedlich beschichtete Transwell-Membranen in FCM

Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwell gegeben, die Membran blieb unbeschichtet (\ominus) oder wurde zuvor entweder mit Matrigel™ (MG) oder mit MG und Endothelzellen (MG+EC) beschichtet. In der unteren Kammer war FCM und CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt und nach 18h Kultivierung durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden nach Isolierung (Input) in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert (Input + 20h). Analysiert wurde die CCR6-Expression auf den CD14_{low} Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis für n=2 Experimente.

Die Ergebnisse der sequenziellen Migration können als Schlüsselergebnisse für die Untersuchung der Einwanderung und der Differenzierung von Monozyten in die Haut angesehen werden. Es konnte die selektive Wirkung des FCM auf die beiden Monozyten-Subpopulationen gezeigt werden. CD14_{high} Zellen exprimierten nach spezifischer Migration die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR3, wohingegen nicht migrierte Monozyten die CCR2-Expression herunterregulierten. Ausschließlich CD14_{low} Monozyten wurden durch Fibroblasten-sezernierte Faktoren induziert, CD1a und CCR6 zu exprimieren, wodurch die CD14_{low} Zellen zu dermalen DC-ähnlichen Zellen differenzierten.

Darüber hinaus scheint die unterschiedliche Expression der Chemokinrezeptoren und die damit korrelierende Stärke der CD14 Expression einen Hinweis zu geben, dass es schon innerhalb der Monozyten im peripheren Blut eine gewisse Vorprogrammierung für unterschiedliche Differenzierungsmöglichkeiten geben könnte.

Neben der Rolle der Endothelzellen bei der Adhäsion der DC Vorläuferzellen an den Gefäßwänden scheinen sie außerdem Einfluss auf den Weg der Differenzierung der Monozyten zu nehmen. Sie tragen dazu bei, dass CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Zellen stabilisiert wird und die Expression von CCR6 auf den CD14_{low} Zellen verstärkt wird.

3.3.4 Rolle des Chemokinrezeptors CCR2 auf den Monozyten

Zusätzlich zu der Migration von Monozyten in konditionierte Medien wurde ihre Migration auf humanes rekombinantes MCP-1 hin untersucht, da es im FCM nachgewiesen werden konnte (Abb.3.2.8) und vermutlich eine Rolle bei der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Haut spielt. Ebenfalls wurde die Expression des hochaffinen MCP-1 Rezeptors CCR2 im Verlauf der Migration von Monozyten auf MCP-1 hin untersucht, indem ein inhibierender anti-CCR2 Antikörper vor Beginn der Migration zu den Monozyten gegeben wurde. Dieser Versuch wurde nur einmal ausgeführt, dennoch gibt das Ergebnis weitere Hinweise auf die Wirksamkeit von Fibroblasten-sezernierten Faktoren auf Monozyten.

Die CD14_{high} Monozyten migrierten deutlich spezifisch auf MCP-1 hin durch die mit Endothel und MatrigelTM beschichtete Transwell-Membran (Abb.3.3.13). Diese Migration konnte sowohl durch den anti-MCP-1 Antikörper wie auch durch einen spezifischen Antikörper gegen CCR2 inhibiert werden, wobei der anti-CCR2 Antikörper die stärkere Inhibition hervorrief (Abb.3.3.13). Der anti-MCP-1 Antikörper wurde, wie schon vorher beschrieben, 30 min. vor Beginn der Migration mit dem rekombinanten MCP-1 vorinkubiert. Die Behandlung der Monozyten mit dem anti-CCR2 Antikörper erfolgte ebenfalls 30 min. vor Beginn der Migration. Der Antikörper wurde danach nicht abgewaschen, da die Monozyten nur gering manipuliert werden sollten.

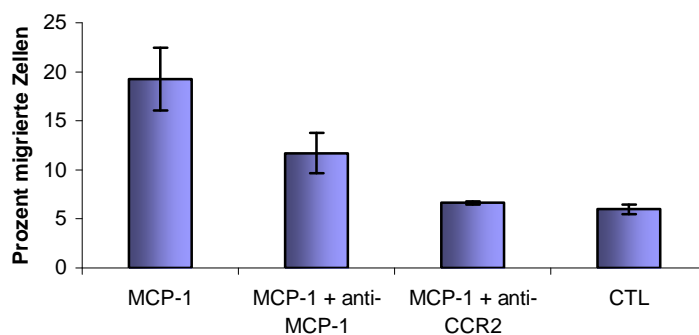


Abb.3.3.13 Migration von Monozyten auf MCP-1 hin; Inhibition durch einen anti-MCP-1 oder einen anti-CCR2 Antikörper

Monozyten wurden in die obere Transwell-Kammer gegeben, die Membran wurde zuvor mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtet. Ein Teil der Monozyten wurde vor der Migration für 30 min. mit anti-CCR2 Antikörpern (0,5 µg/ml) inkubiert. In der unteren Kammer war rekombinantes MCP-1 (10 ng/ml) als Chemoattraktans oder Kontrollmedium (CTL). Optional wurde ein anti-MCP-1 Antikörper 30 min. vor Migration mit dem MCP-1 inkubiert. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der migrierten Monozyten.

Die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren wurde auf der Oberfläche migrierter Monozyten 20h nach der Migration untersucht. Innerhalb der 20h wurden die migrierten Zellen unter den jeweiligen Migrations-Bedingungen kultiviert. Die deutlichste Auswirkung der Migration zeigte sich bei der Expression von CCR2 auf der Oberfläche von CD14_{high} Zellen (Abb.3.3.14). Während die Zellen direkt nach Aufreinigung zu 30% CCR2-positiv waren, trugen nur noch ca. 2% der Zellen, die in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert worden waren, CCR2 auf ihrer Oberfläche. Dagegen waren 35% der CD14_{high} Zellen, die spezifisch auf MCP-1 hin migriert waren, CCR2-positiv. Dieser Effekt wurde deutlich durch die Zugabe des MCP-1 neutralisierenden Antikörpers aufgehoben. Auch die Vorbehandlung der Monozyten mit dem anti-CCR2 Antikörper führte dazu, dass die CD14_{high} Zellen nach Migration auf MCP-1 hin und Inkubation nur noch gering CCR2 auf der Oberfläche exprimierten. Die Zellen, die unspezifisch in das Kontrollmedium migriert waren, exprimierten CCR2 ebenso wenig, wie die nicht migrierten Zellen (Input + 20h).

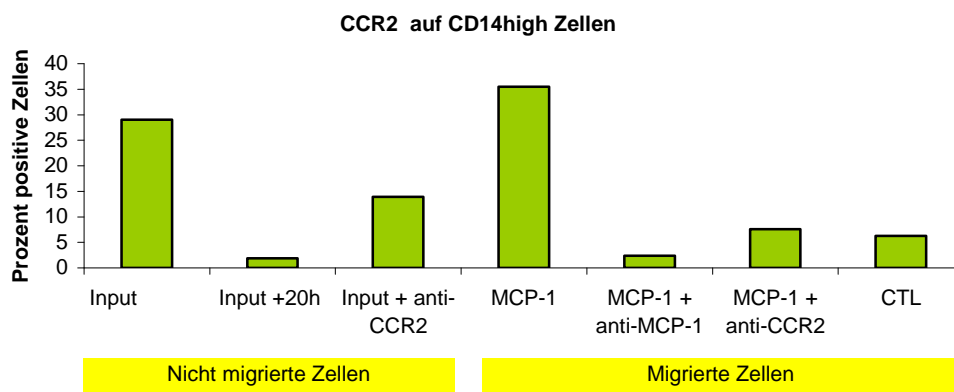


Abb.3.3.14 CCR2-Expression auf CD14_{high} Monozyten nach Migration auf MCP-1 hin

Monozyten wurden nach Aufreinigung (Input) auf die Expression von CCR2 auf ihrer Oberfläche immunzytometrisch untersucht. Nach Migration durch die mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran auf MCP-1 (10 ng/ml) und anschließende Kultivierung (20h) unter den jeweiligen Bedingungen wurden die Monozyten erneut auf ihre CCR2-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Ein Teil der Monozyten wurde vor Migration mit dem gleichen anti-CCR2 Antikörper (5 µg/ml) behandelt, der später für die FACS-Analyse eingesetzt wurde.

Wie bei den CD34⁺DC konnte auch für die Monozyten gezeigt werden, dass sie spezifisch auf MCP-1 hin migrierten. MCP-1 wurde als ein Chemokin im FCM identifiziert, das für die Stabilisierung von CCR2 auf migrierten CD14_{high} Monozyten verantwortlich ist.

Um die Rolle von CCR1 zu untersuchen, wurde ein neutralisierender anti-CCR1 Antikörper in der transendothelialen Migration auf MCP-1 hin eingesetzt. Wie der anti-CCR2 Antikörper konnte auch der anti-CCR1 Antikörper die spezifische Migration auf MCP-1 hin inhibieren

(nicht gezeigt). Die CCR1-Expression auf den CD14_{high} Monozyten wurde durch Migration auf MCP-1 hin und auch durch Kultivierung hochreguliert (nicht gezeigt).

3.3.5 Identifizierung von Differenzierungsfaktoren für die Vorläuferzellen in den konditionierten Medien

Da sowohl Monozyten als auch CD34⁺DC nach Migration und Inkubation in FCM Differenzierungsimpulse bekamen, wurden alle in den Migrations-Experimenten eingesetzten konditionierten Medien auf Differenzierungsfaktoren untersucht. Mit spezifischen ELISA-Untersuchungen wurden die konditionierten Medien auf TGF- β 1 und GM-CSF untersucht. TGF- β 1 ist entscheidend an der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Langerhans Zellen beteiligt; in der TGF- β 1-defizienten Maus konnten keine Langerhans Zellen nachgewiesen werden (Borkowski et al., 1996). GM-CSF wird für die Induktion von CD1a auf Langerhans Zellen verantwortlich gemacht (Athanasas-Platsis et al., 1995).

Neben den schon vorher eingesetzten konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten wurde auch konditioniertes Medium von postmitotischen Fibroblasten untersucht, wie auch Kulturüberstände von TNF- α - und IL-1 β -stimulierten Keratinozyten. Als Positivkontrolle wurden die rekombinanten Proteine in den jeweiligen Zellkulturkonzentrationen eingesetzt.

In keinem der untersuchten Kulturüberstände konnte GM-CSF nachgewiesen werden, wobei die Positivkontrolle mit dem rekombinanten GM-CSF zu einem deutliches Signal führte (nicht gezeigt).

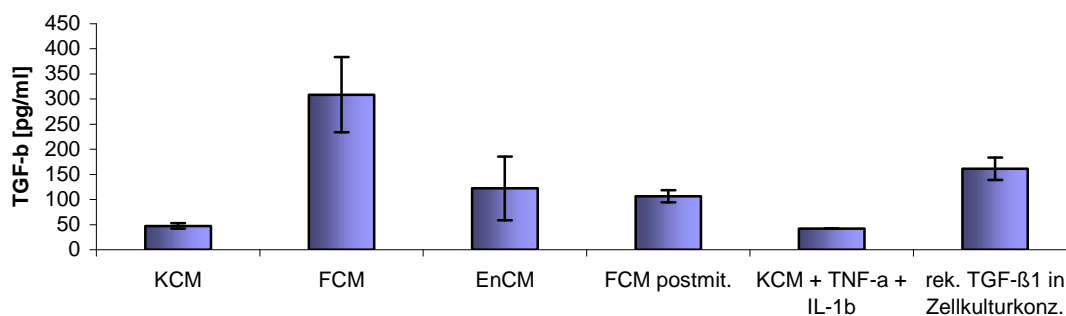


Abb.3.3.15 TGF- β 1 Konzentration in den konditionierten Medien

Dargestellt ist das Ergebnis des TGF- β 1 spezifischen ELISA. Es wurden konditionierte Medien von Fibroblasten (FCM), postmitotischen Fibroblasten (FCM postmit.), Endothelzellen (EnCM), Keratinozyten (KCM) oder von stimulierten Keratinozyten (KCM+TNF- α +IL-1 β) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente rekombinantes TGF- β 1 (1 ng/ml) in Zellkulturkonzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten (+/- SD) eines repräsentativen Ergebnissen von n=2

TGF- β 1 wurde in allen untersuchten Medien nachgewiesen, wobei die Konzentration in dem FCM deutlich höher war als die Konzentration des rekombinanten TGF- β 1 im Differenzierungsmedium für DC (0,3 μ g/ml im FCM und 0,1 μ g/ml im Differenzierungsmedium). Am niedrigsten war die Konzentration von TGF- β 1 in den von Keratinozyten konditionierten Medien (0,05 μ g/ml), wobei die Stimulation der Keratinozyten durch TNF- α und IL-1 β keine Auswirkung auf die TGF- β 1-Konzentration hatte (Abb.3.3.15). Mit ELISA-Untersuchungen konnte kein GM-CSF in den konditionierten Medien nachgewiesen werden. Es bleibt somit offen, durch welches Zytokin in den Medien die Vorläuferzellen induziert wurden, CD1a zu exprimieren. Allerdings konnte TGF- β 1 in allen Medien nachgewiesen werden, wobei unstimulierte noch proliferierende Fibroblasten die höchste TGF- β 1-Menge sezernierten. Die Wiederfindungsrate des TGF- β 1 ELISA lag nur bei ca. 16% des TGF- β 1, das mit 1 ng/ml in der Zellkulturkonzentration eingesetzt worden war. Es ist also davon auszugehen, dass die TGF- β 1-Konzentrationen in den untersuchten Medien tatsächlich deutlich höher als die gemessenen Konzentrationen waren.

3.4 Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis

Vorläuferzellen, die in das dermale Kompartiment eingewandert sind, haben drei Optionen zu differenzieren. Entweder verweilen sie in der Dermis und werden somit zu dermalen DC. Ein großer Anteil der eingewanderten Monozyten könnte andererseits zu Makrophagen differenzieren, die durch das Gewebe patrouillieren. Wohl der kleinste Teil der eingewanderten Vorläuferzellen ist in der Lage, in die Epidermis einzuwandern, um in Langerhans Zellen zu differenzieren.

Dieser letzte Weg einer Langerhans Vorläuferzelle in die Epidermis sollte mit den folgenden Versuchen untersucht werden. In den Experimenten wurden sowohl CD34DC als auch Monozyten aus dem peripheren Blut eingesetzt.

3.4.1 Migration von CD34DC in das epidermale Milieu

CD34DC werden in der Literatur als die klassischen Vorläuferzellen für Langerhans Zellen bei *in vitro* Untersuchungen eingesetzt. CD34DC exprimieren unter anderem den spezifischen Rezeptor für MIP-3 α , CCR6, stark (Abb.3.1.12); sie sind schon zum größten Teil Langerin- (Abb. 3.1.17) und E-Cadherin-positiv (nicht gezeigt). MIP-3 α ist das Chemokin, das hauptsächlich für die Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis verantwortlich gemacht wird (Dieu-Nosjean et al., 2000). MIP-3 α wird in der Haut von Keratinozyten exprimiert. Die Expression von E-Cadherin ist wesentlich für das Verbleiben

der Langerhans Zellen in der Epidermis, da sie über E-Cadherin interzellulären Kontakt mit den Keratinozyten ausbilden (Tang et al., 1993). Die Expression von Langerin wird als eines der Hauptmerkmale der Langerhans Zellen gesehen, da dermale DC Langerin nicht exprimieren (Valladeau et al., 2000).

Neben der Migration in Keratinozyten-konditioniertes Medium (KCM) hinein sollte die Migration der CD34DC auf einige der Chemokine hin, die spezifisch in dem KCM nachgewiesen werden konnten, untersucht werden. Als Keratinozyten-spezifische Chemokine wurden MIP-3 α oder MCP-4 eingesetzt.

Die spezifische transendotheliale Migration von CD34DC in KCM wurde in Abb.3.2.3 gezeigt. Es zeigte sich, dass alle Subpopulationen der CD34DC spezifisch in KCM hinein migrierten, die spezifische Antwort auf KCM-spezifische Faktoren bei den CD1a exprimierenden Subpopulationen war jedoch deutlich stärker als bei den anderen beiden Populationen. DP CD34DC migrierten am stärksten in KCM hinein.

MIP-3 α war eines der Chemokine, das nur in dem konditionierten Medium von Keratinozyten nachgewiesen wurde (Abb.3.2.8). Um die Rolle von MIP-3 α bei der spezifischen Migration in KCM zu untersuchen, wurde ein MIP-3 α spezifischer Antikörper eingesetzt, der die Wirkung von MIP-3 α im KCM neutralisieren sollte. Dafür wurden CD34DC in die obere Transwell-Kammer gegeben, deren Membran zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet worden war. In der unteren Kammer befand sich KCM, das zuvor mit dem spezifischen MIP-3 α Antikörper vorinkubiert worden war. In diesen Experimenten zeigte die Zugabe des Antikörpers auf die Migration der CD34DC keine Wirkung (nicht gezeigt). Um die Funktionalität des eingesetzten MIP-3 α Antikörpers zu überprüfen, wurde dessen Wirkung auf die spezifische Migration von CD34DC auf humanes rekombinantes MIP-3 α hin untersucht. Ähnlich wie in dem Versuchsaufbau zur Neutralisierung von MCP-1 in FCM (Abschnitt 3.3.1) wurde der Antikörper 30 min. vor Beginn der Migration mit der rekombinanten MIP-3 α Lösung inkubiert. Für die Migration wurden CD34DC in die obere Kammer des Transwell-Systems gegeben, die Transwell-Membran wurde zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet. In der unteren Kammer war die MIP-3 α Lösung mit oder ohne Antikörper. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt, gefärbt und immunzytometrisch analysiert.

Die spezifische Migration der CD34DC auf das rekombinante MIP-3 α hin war sehr schwach. Der MI der einzelnen Subpopulationen lag nicht höher als 1,3 im Mittel (nicht gezeigt). Innerhalb der Subpopulationen migrierten die DP CD34DC am stärksten spezifisch auf MIP-3 α hin. Der Antikörper zeigte nur geringe Wirkung auf die spezifische Migration aller

Subpopulationen, wobei die Wirkung am stärksten bei den CD14 exprimierenden Zellen (CD14_{pos} und DP) war (Abb.3.4.1).

Diese Ergebnisse zeigten, dass CD34DC nur sehr schwach spezifisch auf MIP-3 α zu migrierten, und bewiesen, dass der eingesetzte Antikörper neutralisierend auf die MIP-3 α -spezifische Migration wirkte. Für die spezifische Rolle von MIP-3 α bei der chemoattraktiven Wirkung des KCM auf CD34DC lässt sich aus diesem Experiment folgern, dass MIP-3 α nur zu einem geringen Teil zu der KCM-Wirkung beiträgt.

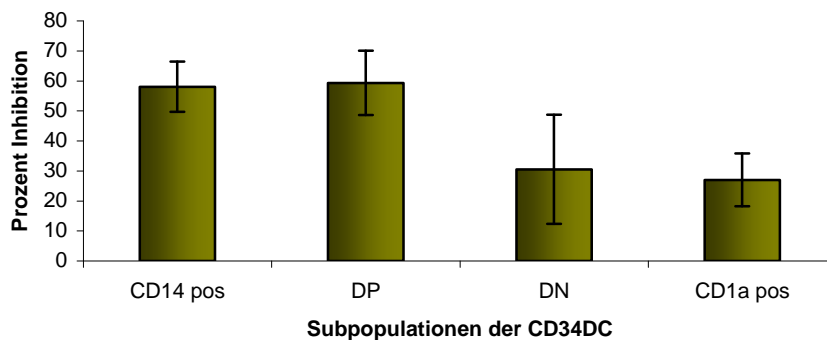


Abb.3.4.1 Inhibition der Migration von CD34DC auf MIP-3 α hin durch einen anti-MIP-3 α Antikörper

1×10^6 CD34DC an d7 wurden in die obere Kammer gegeben, die Transwell-Membran wurde zuvor mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtet. Der anti-MIP-3 α Antikörper (0,5 μ g/ml) wurde vor Beginn der Migration zu der MIP-3 α Lösung (0,5 μ g/ml) in die untere Transwell-Kammer gegeben. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen in der unteren Kammer gezählt, mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Analysiert wurde die Inhibition der Migration der einzelnen Subpopulationen. Gezeigt ist der Mittelwert von n=3 Experimenten(+/- SD).

Ein weiteres Chemokin, das nur in KCM nachgewiesen wurde, war MCP-4 (Abb.3.2.8). Dieses Chemokin ist bislang noch nicht im Zusammenhang mit der Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis untersucht worden. Zunächst wurde die spezifische Migration von CD34DC auf rekombinantes MCP-4 hin untersucht. Um eine mögliche spezifische Antwort zu inhibieren, wurde ein neutralisierender Antikörper benötigt. Die MCP-Chemokine haben starke Homologien in der Molekülstruktur, daher wurde der im Labor vorhandene spezifische anti-MCP-1 Antikörper auf Kreuzreaktion gegen MCP-4 getestet.

Alle Subpopulationen migrierten spezifisch auf MCP-4 hin (Abb.3.4.2), wobei die CD14 exprimierenden Subpopulationen am stärksten auf MCP-4 (MI=2,5) zu migrierten. Die Zugabe des anti-MCP-1 Antikörpers zeigte bei allen Subpopulationen außer bei den DN Zellen Wirkung; die spezifische Migration der DP und CD1a_{pos} CD34DC wurde komplett

neutralisiert. Die Antwort der CD14_{pos} Zellen wurde durch den anti-MCP-1 Antikörper nur teilweise inhibiert. Daraus lässt sich folgern, dass der eingesetzte MCP-1 Antikörper mit MCP-4 kreuzreagiert, wodurch er neutralisierend wirkt.

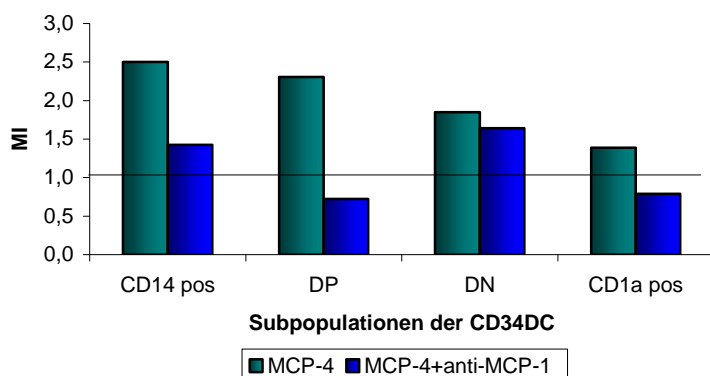


Abb.3.4.2 Migration von CD34DC auf MCP-4 und MCP-4 + anti-MCP-1 Antikörper hin

Die chemoattraktive Wirkung von humanem rekombinantem MCP-4 (1 µg/ml) auf CD34DC wurde untersucht. Optional wurde vor dem Beginn der Migration zu der MCP-4 Lösung ein spezifischer anti-MCP-1 Antikörper (0,5 µg/ml) hinzugegeben. 1×10^6 CD34DC wurden auf die mit Matrigel und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran gegeben. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt, mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der migratorische Index eines repräsentativen Ergebnisses von n=2.

Um die Rolle von MCP-4 in der chemoattraktiven Wirkung von KCM zu untersuchen, wurde der anti-MCP-1 Antikörper eingesetzt. Da in dem KCM außer MCP-4 kein anderes MCP-Chemokin nachgewiesen werden konnte (Abb.3.2.8), war davon auszugehen, dass durch den MCP-1 Antikörper nur die Wirkung von MCP-4 inhibiert werden würde.

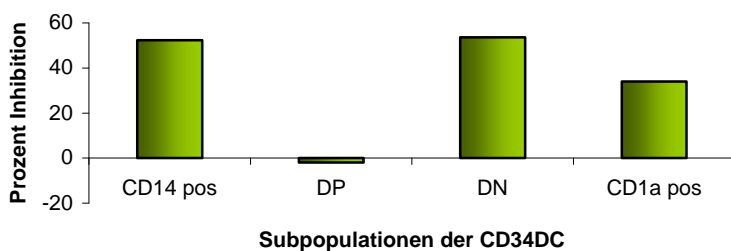


Abb.3.4.3 Inhibition der spezifischen Migration von CD34DC auf KCM hin durch einen anti-MCP-1 Antikörper

1×10^6 CD34DC wurden auf die mit Matrigel und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran gegeben. Der anti-MCP-1 Antikörper (0,5 µg/ml) wurde 30 min. vor Beginn der Migration zu dem KCM gegeben, das sich in der unteren Transwell-Kammer als Chemoattraktans befand. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt, mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgetragen ist die Inhibition der Migration der einzelnen Subpopulationen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Wie in Abb.3.4.3 gezeigt, konnte durch Zugabe des MCP-1 spezifischen Antikörpers die spezifische Migration der CD34DC in das KCM teilweise inhibiert werden. Einzig die Migration der DP Zellen wurde durch den Antikörper nicht beeinflusst.

Die beschriebenen Experimente zeigten, dass CD34DC spezifisch auf die rekombinanten Chemokine MIP-3 α und MCP-4 hin migrierten, wobei die Migration auf MCP-4 hin deutlich stärker war als die Migration auf MIP-3 α hin. Nur die Neutralisierung von MCP-4 wirkte sich auf die spezifische Migration der CD34DC aus. Die Neutralisierung von MIP-3 α im KCM zeigte keine Wirkung.

MCP-4 wird unter anderem durch den Chemokinrezeptor CCR3 gebunden. CCR3 wurde von allen Subpopulationen der CD34DC exprimiert (nicht gezeigt). In einem einmal durchgeführten Experiment wurde vor der Migration die CD34DC mit einem spezifischen anti-CCR3 Antikörper für 30 min. inkubiert. Die Zellen wurden anschließend, ohne gewaschen zu werden, auf die beschichtete Transwell-Membran gegeben, in der unteren Transwell-Kammer war KCM. Die Migration von CD34DC in KCM hinein wurde durch Zugabe des anti-CCR3 Antikörpers nur gering inhibiert (Abb.3.4.4), die Migration der CD14_{pos} Zellen wurde durch den Antikörper am geringsten beeinflusst.

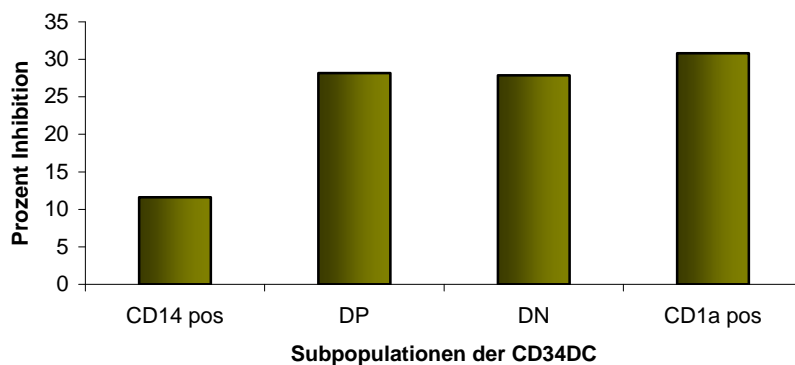


Abb.3.4.4 Inhibition der spezifischen Migration von CD34DC in KCM hinein durch einen anti-CCR3 Antikörper

Der anti-CCR3 Antikörper (5 μ g/ml) wurde vor Migration für 30 min. mit den CD34DC inkubiert. Die Zellen wurden danach auf die mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran gegeben. In der unteren Transwell-Kammer war KCM als Chemoattraktans. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt, mit spezifischen Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die prozentuale Inhibition der Migration der einzelnen Subpopulationen durch den Antikörper.

Zusammenfassend ergibt sich, dass bei der Migration der CD34DC in KCM die Subpopulationen unterschiedlich stark spezifisch migrierten (Abb.3.2.3). Die CD1a-

exprimierenden Zellen migrierten stärker in KCM als die beiden anderen Populationen. Obwohl CD34DC spezifisch auf MIP-3 α und MCP-4 hin migrierten und beide Chemokine in KCM nachgewiesen wurden, konnte nur der MCP-4-neutralisierende Antikörper die Migration der CD34DC auf KCM hin teilweise inhibieren. Die Zugabe eines anti-CCR3 Antikörper beeinflusste die Migration auf KCM hin nur geringfügig.

3.4.2 Migration monozytärer Vorläuferzellen in das epidermale Milieu

Monozyten sind die möglichen Langerhans Vorläuferzellen im Blut. Chemoattraktantien, die von der Epidermis stammen, können Monozyten im Blut nur indirekt beeinflussen. Chemokine, die von den Keratinozyten sezerniert werden, z.B. während einer Entzündungsreaktion, bilden entlang des dermalen Kompartiments einen Gradienten. Dieser Chemokingradient kann unter anderem Endothelzellen direkt induzieren, ihrerseits Chemokine zu sezernieren oder die Chemokine der Keratinozyten zu binden, um sie auf ihrer Oberfläche entlang des Blutgefäßes zu präsentieren. Weiterhin können Endothelzellen durch von Keratinozyten abstammende Zytokine induziert werden, Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche zu exprimieren bzw. die Expression zu verstärken, wodurch Monozyten induziert werden zu adhären und in das Gewebe zu immigrieren (Nickoloff and Naidu, 1994). Substanzen, die von Keratinozyten sezerniert wurden, können auch Fibroblasten induzieren, ihrerseits Chemoattraktantien zu produzieren, um immunkompetente Zellen zur Adhäsion an den Endothelzellen zu induzieren (Nourshargh and Marelli-Berg, 2005). Insgesamt ist das Chemokin-Milieu in einem Gewebe kein starrer Zustand, alle Zellen üben indirekt oder direkt Einfluss auf einander aus.

Für die Untersuchung des Einflusses von Faktoren der Keratinozyten auf Monozyten schien es daher sinnvoll, frisch isolierte Monozyten zunächst durch Endothelzellen auf Fibroblasten-konditioniertes Medium migrieren zu lassen, bevor ihnen das Medium, konditioniert von Keratinozyten, präsentiert wurde. Die Migration von Monozyten in Keratinozyten-konditioniertes Medium wurde daher im Zusammenhang mit der sequenziellen Migration untersucht (Abschnitt 3.3.3) Obwohl in diesem Abschnitt schon auf die Ergebnisse der Migration auf FCM hin, gefolgt von der Migration in KCM hinein, eingegangen wurde, werden hier diese Ergebnisse kurz zusammengefasst dargestellt.

Nur Monozyten, die in FCM hinein migriert waren und darin kultiviert wurden, migrierten in einer zweiten Migration spezifisch auf KCM hin (Abb.3.3.5). Ausschließlich die CD14_{low} Monozyten, die durch Migration und Kultivierung in FCM induziert wurden, CD1a zu exprimieren, exprimierten auch nach der zweiten Migration CD1a, wobei die spezifisch in KCM migrierten CD14_{low} Zellen CD1a ein wenig stärker exprimierten. Alle Monozyten, die

zunächst in FCM und anschließend in KCM migriert waren, exprimierten die analysierten Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR3 und CX₃CR1 geringer bzw. gleich stark wie vor der zweiten Migration. Genauso nahm die Expression der Chemokinrezeptoren auf den Zellen ab, die während der ersten Migration nicht migriert waren, sondern nur in Monozyten-Medium kultiviert wurden (Siehe Tabelle IV im Anhang). CCR6 wurde unabhängig von dem Medium, das während der zweiten Migration in der unteren Transwell-Kammer war, gleich stark auf den CD14_{low} Zellen, die zuvor in FCM hinein migriert waren, exprimiert.

Die zweite Migration in KCM hinein wirkte sich auf zwei verschiedene Arten auf die Monozyten aus. Zum einen nahm mit der Verringerung der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche die Fähigkeit der Vorläuferzellen ab, auf Chemokine zu reagieren, unabhängig von den Chemokinen und deren Herkunftszellen. Somit scheinen die Zellen, die zunächst in FCM und anschließend in KCM hinein migrierten, weniger Möglichkeiten zu besitzen, ihren Standort im Gewebe zu verändern.

Als zweites bewirkte die spezifische Migration in KCM, dass die Expression von CD1a auf den CD14_{low} Zellen verstärkt wurde. Die Stärke der CD1a-Expression gibt einen Hinweis auf den Grad der Differenzierung der Vorläuferzellen zu einer DC. Aus der verstärkten CD1a-Expression nach der zweiten Migration in KCM kann gefolgert werden, dass Keratinozyten durch sezernierte Faktoren die Differenzierung der CD14_{low} Zellen zu DC verstärken.

Um mögliche Kandidaten zu eruieren, die indirekt oder direkt Einfluss auf die Differenzierung nehmen könnten, wurde die spezifische Migration von Monozyten auf MIP-3 α und auf MCP-4 hin untersucht, allerdings ohne eine vorgeschaltete erste Migration in FCM hinein oder eine Kultivierung darin.

In diesen Experimenten wurde die Migration immer durch Transwell-Membranen untersucht, die mit MatrigelTM und Endothelzellen beschichtet waren.

Es konnte keine spezifische Migration von Monozyten auf MIP-3 α hin beobachtet werden (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis passt zu dem Befund, dass der einzig bekannte MIP-3 α Rezeptor CCR6 nicht oder nur sehr gering auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert wurde (Abb. 3.1.6/7).

In Abb.3.4.5 ist die spezifische Migration von Monozyten auf MCP-4 hin dargestellt. Die Monozyten migrierten konzentrationsabhängig auf MCP-4 hin, wobei innerhalb der getesteten Konzentrationen kein Wirkplateau erreicht wurde.

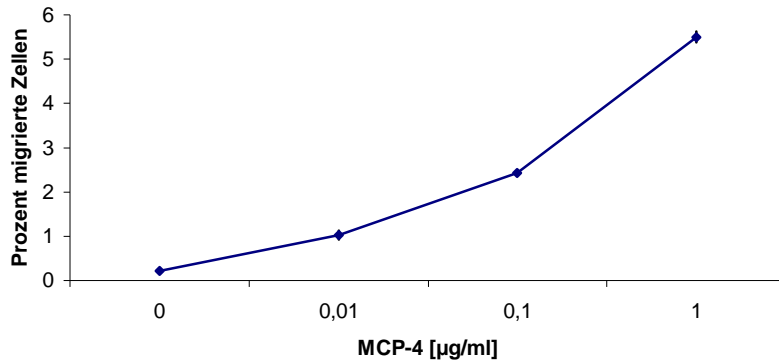


Abb.3.4.5 Konzentrationsabhängige Migration von Monozyten auf MCP-4 hin

Monozyten wurden auf Transwell-Membranen gegeben, die zuvor mit Matrigel und Endothelzellen beschichtet wurden. In der unteren Kammer waren ansteigende Konzentrationen von MCP-4 in Monozyten-Medium gelöst. Nach 4h wurden die migrierten Zellen gezählt. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der migrierten Zellen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der vorher beschriebene anti-MCP-1 Antikörper zur Neutralisierung der MCP-4-spezifischen Migration von Monozyten eingesetzt. Dafür wurde in die untere Transwell-Kammer das rekombinante MCP-4 gegeben und optional 30 min. vor Beginn der Migration der anti-MCP-1 Antikörper dazugegeben. Monozyten wurden auf die mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtete Transwell-Membran überführt. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und unter den Migrations-Bedingungen weiterkultiviert. Nach 20h wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und immunzytometrisch analysiert.

Zum einen ergab sich in diesem Experiment, dass die spezifische Migration der Monozyten auf MCP-4 hin durch die Zugabe des Antikörpers um ca. 40% inhibiert wurde (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden die CD14_{low} Zellen induziert, nach Migration und Kultivierung in MCP-4 CCR6 zu exprimieren (Abb.3.4.6). Die Zugabe des anti-MCP-1 Antikörpers inhibierte dies gering. Auf den CD14_{high} Monozyten konnte zu keinem Zeitpunkt CCR6 nachgewiesen werden, wie auch kein CD1a auf den Zellen nachgewiesen werden konnte.

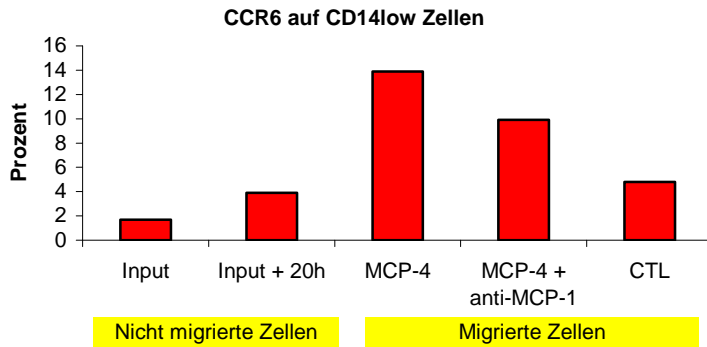


Abb.3.4.6 Expression von CCR6 auf CD14_{low} Zellen nach Migration auf MCP-4 hin

Frisch isolierte Monozyten wurden auf die Transwell-Membran gegeben, die zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet wurden. In der unteren Kammer war rekombinantes MCP-4 oder zusätzlich noch der anti-MCP-1 Antikörper. Der Antikörper wurde 30 min. vor Beginn der Migration in die MCP-4 Lösung gegeben. Nach vier Stunden wurden die Zellen gezählt. Nach weiteren 20h Kultivierung in den jeweiligen Bedingungen wurden die Zellen immunzytometrisch analysiert.

Obwohl dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde, gibt das Ergebnis dennoch Hinweise darauf, dass Keratinozyten über MCP-4, einem nur im KCM nachgewiesenen Chemokin, durch die spezifische Migration und die Induktion von CCR6 Einfluss auf Monozyten nehmen konnten. Zum anderen zeigt die fehlende spezifische Migration auf MIP-3 α hin, dass Monozyten zunächst einen Impuls, z.B. durch Fibroblasten, bekommen müssen, um auf MIP-3 α reagieren zu können.

3.5 Untersuchung aller Hautkompartimente in einem *in vitro* Hautmodell

In den vorstehend beschriebenen Experimenten zur Migration von Monozyten und CD34DC im Transwell-System wurden die einzelnen Schritte der Einwanderung von Langerhans Vorläuferzellen aus dem Blut in die Epidermis untersucht. Um das Zusammenspiel der einzelnen Migrationsschritte zu untersuchen, sollte ein Hautmodell entwickelt werden, in dem die Immigration der Langerhans Vorläuferzelle orientiert an der *in vivo* Situation untersucht werden sollte.

Im Gegensatz zu bereits existierenden Hautmodellen, in denen die Langerhans Vorläuferzellen auf die Epidermis gegeben wurden (Regnier et al., 1997) und somit keine Immigration beobachtet werden konnte, sollte in dem hier entwickelten Hautmodell gerade die Immigration im Mittelpunkt des Interesses liegen. Das hier etablierte Hautmodell basiert auf dem von (Prunieras et al., 1983) beschriebenen Modell, das schon in anderen Untersuchungen eingesetzt wurde (Sivard et al., 2003).

Das Hautmodell sollte aus den drei Zellkompartimenten bestehen, denen die Vorläuferzellen auf ihrem Weg in die Epidermis begegnen, dem Endothel, der Dermis sowie der Epidermis. Hierfür wurden die gleichen Keratinozyten und Endothelzellen eingesetzt, von denen in den vorher beschriebenen Experimenten die konditionierten Medien gewonnen wurden. Die Dermis wurde aus Hautlappen aufgereinigt, die bei chirurgischen Eingriffen anfielen (siehe Abschnitt 2.3.6). Um das Hautmodell immunologisch inert zu halten, wurden alle immunkompetenten Zellen entfernt (deepidermisieren) oder abgetötet (einfrieren und auftauen).

3.5.1 Entwicklung des 3-Kompartimenten-Modells

Zunächst wurde das Hautmodell nach Prunieras et al (1983) zusammengefügt, das aus einer dermalen Schicht und einer epidermalen Schicht besteht. Auf die epidermale Seite der deepidermisierten Dermis (DED) wurden Keratinozyten gegeben und zwei Wochen kultiviert. Innerhalb der ersten Wochen wurde zunächst das Proliferationsmedium gegen ein Differenzierungsmedium ausgetauscht, wodurch die Keratinozyten nach einer reinen Proliferationsphase in die Differenzierungsphase überführt wurden. In der zweiten Woche wurde die Dermis mit der epidermalen Seite nach oben auf ein Gitter überführt, das so gebogen war, dass die Dermis von unten noch mit Nährstoffen versorgt wurde, die epidermale Seite jedoch der Luft ausgesetzt war. Der Kontakt zu Luftsauerstoff ist essentiell für die Ausbildung einer kompletten Epidermis, die aus mehreren Ebenen bestehen soll (Abb.3.5.1).

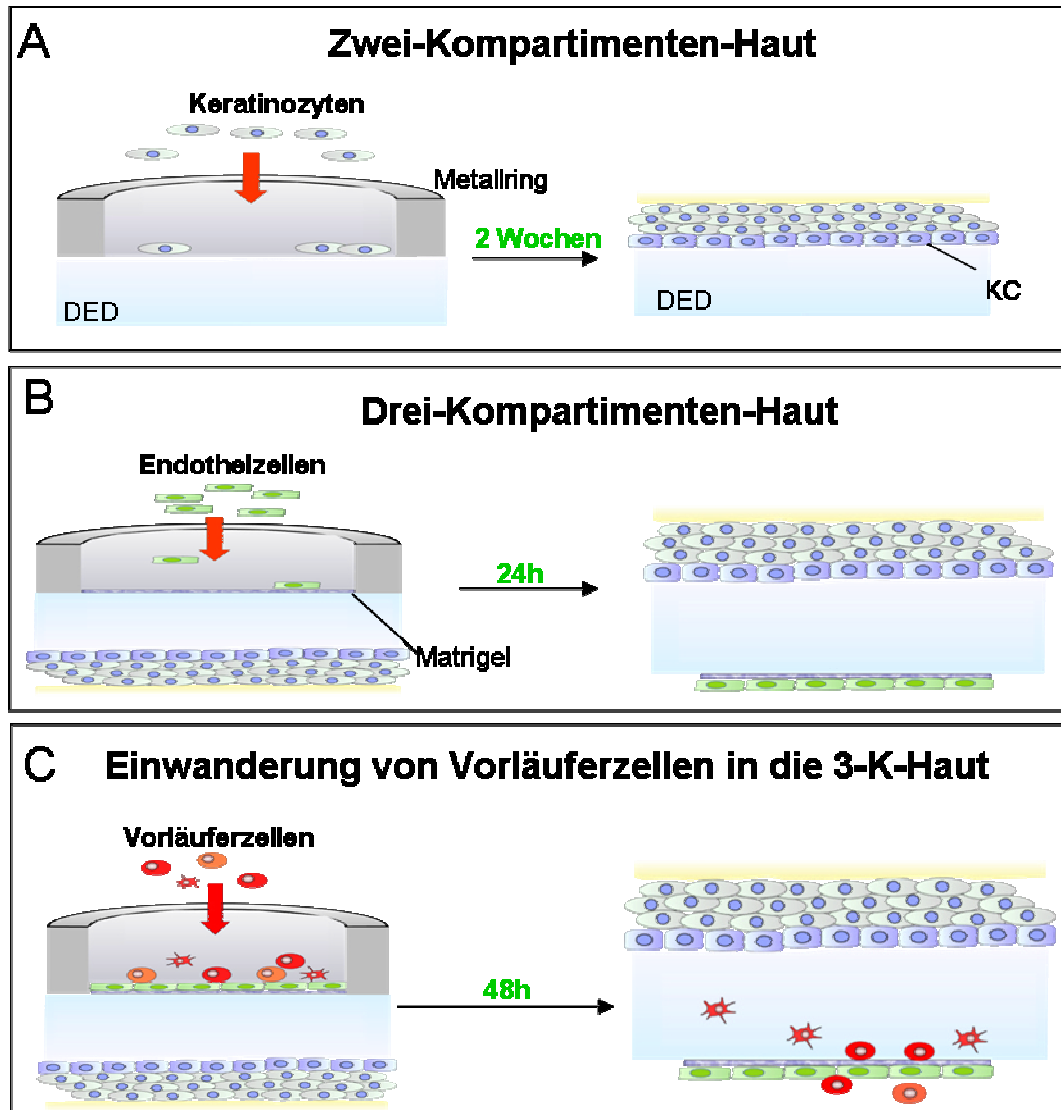


Abb.3.5.1 Aufbau der 3-Kompartimenten-Haut (3-K-Haut)

Um die Einwanderung von Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde zunächst die 2-Kompartimenten Haut, bestehend aus deepidermisierte Dermis (DED) und Keratinozyten, aufgebaut (A). Als drittes Kompartiment wurde zusammen mit Matrigel™ und den Endothelzellen die endotheliale Schicht aufgebracht (B). Für die Untersuchung der Einwanderung von Vorläuferzellen wurden ca. 1×10^6 Vorläuferzellen auf die 3-K-Haut in den Metallring gegeben. Nach 24h-48h wurde die Haut fixiert und immunhistologisch analysiert.

In Abb.3.5.2 ist ein histologischer Schnitt durch die 2-Kompartimenten-Haut (2-K-Haut) abgebildet. Die Keratinozyten sind gleichmäßig an der DED angewachsen und haben die unterschiedlichen Schichten der Epidermis ausgebildet. In der untersten Schicht befinden sich die Zellen, die konstant proliferieren, wodurch die einzelnen Ebenen immer weiter nach oben geschoben werden. In der obersten Schicht, der Hornschicht, befinden sich die toten keratinisierten Zellen.

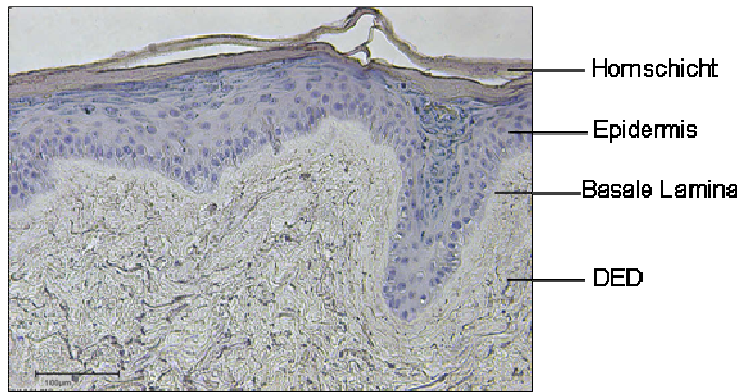


Abb.3.5.2 HE-Färbung der 2-Kompartimenten Haut

Die DED mit den proliferierenden Keratinozyten wurde 7 Tage in Kulturmedium inkubiert, bevor sie auf ein Gitter gebracht wurde, wodurch die Dermis von unten mit Medium versorgt wurde und die epidermale Seite an der Luft war. Die Haut wurde nach 7 Tagen auf dem Gitter in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Das Bild stellt einen 4µm dicken Hautschnitt dar, der mit Hämatoxylin/Eosin (HE) angefärbt wurde. Blau gefärbt sind die Zellkerne. (Vergrößerung: 200x)

Nach der Etablierung der 2-K-Haut wurde im nächsten Schritt versucht, auf die dermale Seite eine endotheliale Schicht aus HDMEC aufzubringen. Dabei zeigte sich, dass für die Endothelzellen die dermale Seite der DED kein optimales Substrat darstellte, um einen geschlossenen Zellrasen zu bilden. Da schon in den vorangegangenen Transwell-Versuchen gezeigt wurde, dass die Endothelzellen optimal auf Matrigel™ anwachsen, wurde die dermale Seite mit Matrigel™ beschichtet, bevor die Endothelzellen in den Metallring überführt wurden. Abb.3.5.3 zeigt das Anhaften der Endothelzellen an die beschichtete und unbeschichtete DED. Endothelzellen, die auf Matrigel™ gegeben wurden, bildeten einen geschlossenen Zellrasen im Gegensatz zu den Zellen, die auf die unbeschichtete DED gegeben wurden. Der Hautschnitt wurde mit einem anti-CD31 Antikörper immunhistologisch angefärbt. Die CD31 positiven Endothelzellen bildeten mit lang ausgestreckter Morphologie eine geschlossene Zellschicht. Bei der unbeschichteten DED lagen die Endothelzellen ungeordnet und in runder Form vor, sie adhärten nicht an der DED.

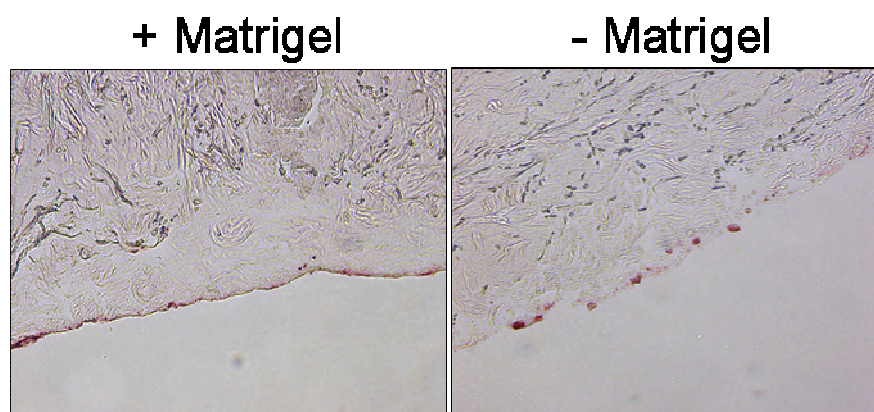


Abb. 3.5.3 Adhäsion von Endothelzellen an die 2-K-Haut

Endothelzellen wurden auf die dermale Seite der 2-K-Haut in den Metallring überführt. Diese Seite der 2-K-Haut wurde vorher mit Matrigel™ beschichtet oder blieb unbehandelt. Nach 48h Inkubation wurde die Haut in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit einem spezifischen anti-CD31 Antikörper wurden die Hautschnitte immunhistologisch gefärbt. (Vergrößerung: 200x)

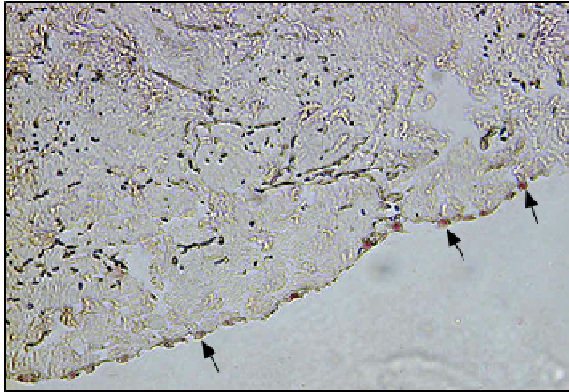
Der erfolgreiche Zusammenbau der 3-K-Haut eröffnete die Möglichkeit, alle Fragestellungen, die zuvor in den Transwell-Experimenten untersucht wurden, in einem komplexeren Rahmen erneut zu untersuchen. Als Vorteil zu bewerten ist, dass sich in der 3-k-Haut keine von Fibroblasten-sezernierten Faktoren befinden, dadurch können definierte Faktoren gezielt appliziert werden.

3.5.2 Funktionelle Untersuchungen mit dem 3-K-Hautmodell

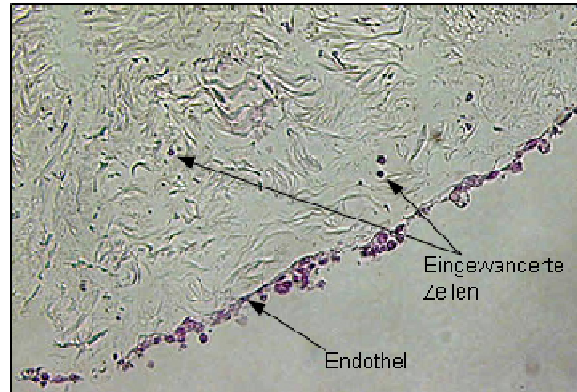
In dem 3-K-Hautmodell sollte die Immigration der unterschiedlichen Vorläuferzellen durch die Kompartimente in die Epidermis untersucht werden. Hierfür wurden nach erfolgreichem Zusammensetzen der 3-K-Haut auf die Endothelzellen ca. 1×10^6 Vorläuferzellen in den Metallring gegeben. Nach 24h oder 48h wurde der Metallring entfernt und optional die Haut in Formaldehyd fixiert oder erneut mit der Epidermis nach oben auf das Metallgitter gelegt und erst nach 2-5 Tagen fixiert. Um eingewanderte Vorläuferzellen zu identifizieren, wurden die Hautschnitte immunhistologisch mit einem Antikörper gegen den DC-Marker CD1a gefärbt. Es stellte sich heraus, dass die Identifizierung der eingewanderten Zellen ein zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelöstes Problem war. Das größte technische Problem stellten die Reste der in der Dermis befindlichen autologen Zellen dar. Durch die Einfrier- und Auftauprozedur waren diese Zellen zwar getötet worden, dennoch waren noch Membranreste vorhanden, die von den eingesetzten Antikörpern ebenfalls gebunden wurden, wodurch falsch positive Signale entstanden (nicht gezeigt). Um dem zu entgehen, wurden die Vorläuferzellen vor der Überführung auf die 3-K-Haut mit einem sogenannten Zell-Tracer, CFSE, angefärbt. Dieser Farbstoff bewirkte nach Internalisierung durch die Zellen, dass diese unter UV-Licht

grün fluoreszierten. Leider war jedoch die Autofluoreszenz des dermalen Kompartiments so stark, dass eine Detektion der markierten Zellen nach Einwanderung in die 3-K-Haut nicht möglich war (nicht gezeigt).

(A) Monozyten d0 CD14 gefärbt



(B) CD34DC d7 HE gefärbt



(C) CD34DC CD1a gefärbt



(D) CD34DC d7 CD14 gefärbt



Abb.3.5.4. Immigrierte Vorläuferzellen in der 3-K-Haut

Jeweils 1×10^6 Monozyten oder CD34DC wurden auf die endotheliale Schicht der 3-K-Haut gegeben und 24h (CD34DC) oder 48h (Monozyten) inkubiert und anschließend in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und immunhistologisch analysiert. (A) Monozyten adhärirt an die 3-K-Haut, gefärbt mit einem monoklonalen CD14-Antikörper. (B) CD34DC immigriert und adhärirt an die 3-K-Haut, gefärbt mit HE. CD34DC immigriert und adhärirt an die 3-K-Haut, gefärbt mit monoklonalen CD1a-Antikörper (C) und CD14-Antikörper (D). (Vergrößerung: 200x)

Abb.3.5.4 zeigt die Ergebnisse einiger Immigrationexperimente, in denen entweder je 1×10^6 Monozyten oder CD34DC (an d7) auf die Endothelzellen gegeben wurden. Die 3-K-Haut wurde danach für 24h (CD34DC) oder 48h (Monozyten) weiterkultiviert und anschließend mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die geschnitten Hautstücke wurden immunhistologisch analysiert. In Abb.3.5.4 (A) wurde ein CD14 Antikörper eingesetzt, um die Monozyten in der 3-K-Haut anzufärben. Es ist zu erkennen, dass die Monozyten an der Endothelschicht gleichmäßig adhärirt hatten. Immigrierte CD14-positive Zellen konnten in der Dermis nicht identifiziert werden. Jedoch wurden in dieser Dermis CD1a-positive Signale

detektiert. Deren Herkunft konnte aber, wie oben beschrieben, nicht zweifelsfrei geklärt werden, daher werden diese Färbungen hier nicht gezeigt. Abb.3.5.4 (B) zeigt die HE Färbung einer 3-K-Haut, auf deren endotheliale Schicht CD34DC d7 gegeben wurden. Es ist zu erkennen, dass wie bei den Monozyten ein Teil der Zellen an die Endothelzellen adhärirt sind. Ein Teil der CD34DC akkumulierte in Haufen an den Endothelzellen. Weiterhin können immigrierte Zellen im unteren Drittel der Dermis identifiziert werden (Pfeile). Wurde diese Haut mit einem Antikörper gegen CD1a behandelt (Abb.3.5.4 (C)), zeigte sich, dass nur ein Teil der Zellen CD1a-positiv war, es wurden auch CD1a-negative Zellen in der Dermis detektiert. Die Färbung gegen CD14 zeigte, dass ein Teil der eingewanderten Zellen CD14 exprimierte (Abb.3.5.4 (D)).

Diese ersten Experimente zur Einwanderung der Vorläuferzellen in ein 3-K-Hautmodell brachten noch keine eindeutigen Erkenntnisse über den Mechanismus der Einwanderung, bzw. über die Differenzierung der Vorläuferzellen im Verlauf der Immigration. Die dargestellten Experimente zeigten dennoch, dass Vorläuferzellen in das 3-K-Haut-Modell immigrieren können, wobei CD34DC besser immigrierten als Monozyten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen und Faktoren untersucht werden, die bei der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Haut eine Rolle spielen. Um die Herkunft der Langerhans Zellen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit in *in vitro* Experimenten Monozyten und CD34_{pos} Stammzellen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe von TGF- β 1 und GM-CSF sowohl Monozyten als auch CD34_{pos} Stammzellen zu Langerhans ähnlichen Zellen differenzierten, identifiziert durch die Expression von Langerin. Um die Funktionalität der auf den Zellen nachgewiesenen Adhäsionsmoleküle zu überprüfen, wurde die Adhäsion an unterschiedliche Proteine der ECM untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass DC, generiert aus den Monozyten oder CD34_{pos} Stammzellen, an Laminin 332 und Fibronectin adhärten, wobei die Subpopulationen der CD34DC unterschiedlich an diese beiden Proteine adhärten. Diese Befunde geben Hinweise auf eine potentielle Lokalisierung der DC in der Haut, da Laminin 332 Hauptbestandteil der Basalmembran ist und Fibronectin u. a. das dermale Kompartiment bildet.

Um die Mechanismen der Immigration zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Migrations-System eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass Endothelzellen entscheidend für die Migration der Vorläuferzellen waren. In Anwesenheit von Endothelzellen erhöhte sich die spezifische Migration der CD34DC in KCM, wohingegen bei den Monozyten die spontane Migration in FCM zunahm. Die Migration der Monozyten in FCM induzierte die Differenzierung der CD14_{low} Monozyten in Richtung dermalen DC-ähnlicher Zellen. Diese Zellen begannen, CD1a und CCR6 auf der Oberfläche zu exprimieren. Dieser Effekt wurde durch die transendotheliale Migration in FCM hinein verstärkt. Außerdem wurde durch die transendotheliale Migration in FCM CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Monozyten stabilisiert. Als ein dafür verantwortlicher Faktor konnte MCP-1 identifiziert werden. CCR2 scheint somit bei der Repopularisierung von Langerhans Zellen in der Haut nach Inflammation eine wichtige Rolle zu spielen. Immigrierte Vorläuferzellen können durch die andauernde CCR2-Expression nach transendothelialer Migration weiterhin auf Liganden von CCR2, die u. a. von Keratinozyten sezerniert werden, hinmigrieren.

Weiterhin bewirkte die transendotheliale Migration der Monozyten in FCM hinein, dass die in FCM migrierten Zellen in einer zweiten nachgeschalteten Migration spezifisch in KCM migrierten, wohingegen nicht migrierte Zellen, die ohne Zytokine kultiviert wurden, nicht

spezifisch in KCM migrierten. Diese Befunde bestätigen die entscheidende Rolle der Endothelzellen bei der Differenzierung von Langerhans Vorläuferzellen und deren Immigration in die Dermis. Dabei werden durch den Kontakt der Vorläuferzellen mit den Endothelzellen sowohl Differenzierungsimpulse in den Vorläuferzellen ausgelöst als auch die Chemotaxis der Vorläuferzellen beeinflusst.

Die Untersuchung auf mögliche Differenzierungsfaktoren in FCM zeigte, dass Fibroblasten physiologisch relevante Mengen an TGF- β 1 sezerniert hatten. GM-CSF konnte im FCM nicht nachgewiesen werden, wodurch offen bleibt, durch welche Zytokine (außer TGF- β 1) die Differenzierung der CD14_{low} Monozyten nach Migration in FCM induziert wird.

Innerhalb der CD34DC migrierten die CD14_{pos} Subpopulation am stärksten in FCM hinein, wohingegen die DP Subpopulation am stärksten in KCM hinein migrierte. Diese Migration wurde nicht durch einen Antikörper beeinflusst, der die Wirkung von MCP-4 neutralisierte. MCP-4 war eines der Chemokine, das nur in KCM nachgewiesen werden konnte, und es wirkte als Chemoattraktans für alle Subpopulationen der CD34DC. Die transendotheliale Migration auf MCP-4 hin induzierte auf den CD14_{low} Monozyten die Expression von CCR6.

Diese Befunde weisen auf die selektive Wirkung der Chemokine hin. Zum einen induzieren sie die selektive Migration von Zellen in einem Gewebe, zum anderen scheinen sie, in Kombination mit der transendothelialen Migration, Differenzierungen in den migrierenden Zellen zu induzieren.

In einem 3-Kompartimenten-Hautmodell wurden Endothelzellen, dermale Komponente und Keratinozyten zusammengefügt, um die Untersuchungen der Immigration der Vorläuferzellen der *in vivo* Situation anzupassen. Matrigel™, ein Äquivalent der extrazellulären Matrix (ECM), war entscheidend für das Anwachsen der Endothelzellen an die Dermis, ohne Matrigel™ konnten Endothelzellen nicht an der Dermis adhären.

Erste funktionelle Untersuchungen innerhalb der 3-K-Haut zeigten, dass CD34DC in den unteren dermalen Bereich der 3-K-Haut immigrierten, hingegen adhärten Monozyten nur an den Endothelzellen.

Die Diskussion dieser Ergebnisse gliedert sich in folgende Abschnitte: Zunächst wird kurz auf die Methoden eingegangen, die zur Untersuchung der Mechanismen und Faktoren der Immigration eingesetzt wurden. In den darauffolgenden Abschnitten sollen die beiden Zelltypen als potentielle Langerhans Vorläuferzellen diskutiert werden. In den letzten beiden Abschnitten wird die Rolle der einzelnen Hautkompartimente bei der Immigration analysiert. Zum Schluss wird auf das entwickelte Haut-Modell eingegangen, das alle Komponenten zusammenbringen sollte.

4.1 Methoden zur Untersuchung der Immigration von Langerhans Vorläuferzellen

Die Vorläuferzellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie in einem 2-Laser Gerät, das mehrere Fluoreszenzen parallel analysieren kann, phänotypisiert. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Expression der Integrine und der Chemokinrezeptoren, die bei der Immigration der Vorläuferzellen in der Haut relevant sein könnten.

Um die Ergebnisse der FACS-Analyse mit einer zweiten Methode zu bestätigen, wurde mRNA aus den Zellen aufgereinigt und RT-PCR durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass auf der Ebene der Gen-Expression Integrine und Chemokine exprimiert wurden, die in der FACS-Analyse nicht detektiert werden konnten. Hierzu kann als Erklärung die Sensitivität des eingesetzten FACS-Gerätes herangezogen werden, die laut Hersteller bei ca. 100 MESF (molecules of equivalent soluble fluorophore) liegt. Das bedeutet, das FACS-Gerät detektiert erst ab einer Anzahl von ca. 100 Molekülen pro Zelle Proteine auf der Zelloberfläche, wobei diese Moleküle durch spezifische Antikörper gebunden sein müssen, die wiederum an Fluorophore gekoppelt sind.

Daraus kann gefolgert werden, dass in den Vorläuferzellen Integrine und Chemokinrezeptoren exprimiert wurden, die in der FACS-Analyse nicht nachgewiesen werden konnten. Um die Anwesenheit dieser Moleküle durch funktionelle Methoden nachzuweisen und um deren Aufgabe bei der Immigration zu untersuchen, wurden Adhäsionstests und Migrations-Experimente durchgeführt.

Die Adhäsions-Tests wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Aumailley (Institut für Biochemie, Köln) durchgeführt. Dabei sollte die Adhäsion von DC, generiert aus Monozyten und CD34_{pos} Zellen an unterschiedliche Proteine der ECM untersucht werden. Die adhärenierten Zellen wurden fixiert und immunhistologisch mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt. Es wurden keine Doppelfärbungen durchgeführt, daher kann aus diesen Ergebnissen keine Aussage über das differentielle Adhäsionsverhalten der vier Subpopulationen innerhalb der CD34DC gemacht werden.

Für die funktionelle Untersuchung der Chemokinrezeptoren und um mögliche Differenzierungen in den migrierten Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden Migrations-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde ein Transwell-System eingesetzt, in dem zwei Kammern durch eine poröse Membran voneinander getrennt sind. Der Vorteil dieses System ist, dass die Zellen in der oberen Kammer durch eine chemotaktisch wirkende Substanz induziert werden, in die untere Kammer zu migrieren. Um die transendotheliale Migration zu

untersuchen, wurde die Membran mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet. Der Nachteil dieses Systems ist, dass nur gelöste Faktoren auf chemoattraktive Wirkung untersucht werden können. Mögliche Differenzierungsvorgänge, die durch Zell-Zell-Kontakt induziert werden, konnten in diesem Modell nicht berücksichtigt werden.

In den Transwell-Experimenten wurden konditionierte Medien von unstimulierten Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten eingesetzt, da die Immigration der Langerhans Vorläuferzellen in die Haut im ruhenden Zustand untersucht werden sollte. Als Fibroblasten wurden die im Labor vorhandenen IMR-90 Zellen eingesetzt, deren Abstammung die Lunge eines weiblichen Foetus war. Obwohl jedes Gewebe aus spezifischen Zellen aufgebaut wird, lassen sich die Ergebnisse mit den hier eingesetzten IMR-90 Fibroblasten auf die dermale Situation transferieren, da sie wie auch die dermalen Fibroblasten im Bindegewebe lokalisiert sind.

Um ein größtmögliches Spektrum der Analyse auf chemotaktische Substanzen in den konditionierten Medien zu erhalten, wurde ein Chemokin-Array-Test durchgeführt, der 38 Chemokine qualitativ nachweisen konnte. Es wurden keine quantitativen Analysen der mit diesem Test nachgewiesenen Chemokine durchgeführt.

Ein Teil der nachgewiesenen Chemokine wurde deshalb in rekombinanter Form in Transwell-Migrationsexperimenten eingesetzt, um ihre chemotaktische Wirkung auf die beiden Vorläuferzellarten genauer zu untersuchen.

Mit Hilfe von ELISA-Untersuchungen wurden die konditionierten Medien auf Differenzierungsfaktoren analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Wiederfindungsrate des TGF-β1 ELISA nur bei 16% lag. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass laut Protokoll des Herstellers die Zellkulturüberstände angesäuert werden sollten, um das darin enthaltende TGF-β1 zu denaturieren. Das als Standard mitgelieferte rekombinante Protein sollte nicht angesäuert werden. Als Positivkontrolle des ELISA wurde rekombinantes TGF-β1 eingesetzt, und es wurde wie die Zellkulturüberstände behandelt und ebenfalls angesäuert. Möglicherweise kam es zu der schlechten Wiederfindungsrate, weil der Nachweis-Antikörper rekombinantes TGF-β1 nur im nativen Zustand nachweisen kann.

Um alle Komponenten zusammenzubringen, die bei der Immigration von Langerhans Zellen in der Epidermis eine Rolle spielen, wurde eine 3-Kompartimenten-Haut entwickelt. Diese 3-K-Haut bestand aus einer Endothelschicht, der dermalen Matrix und der Epidermis.

Für funktionelle Untersuchungen in dem Haut-Modell ist es wesentlich, immigrierte Vorläuferzellen identifizieren zu können. Dabei gab es zwei bislang ungelöste technische Probleme: Erstens banden die in der immunhistologischen Analyse eingesetzten Antikörper

auch an Membranreste toter dermaler Zellen, wodurch falsch positive Signale entstanden. Also wurden die Vorläuferzellen vorher mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, um sie in der Haut identifizieren zu können. Zweitens zeigte sich, dass die Autofluoreszenz der dermalen Matrix so groß war, dass eine Identifizierung dieser markierten Zellen nicht möglich war. Um diese 3-Kompartimenten-Haut in funktionellen Analysen einsetzen zu können, müssten diese Probleme gelöst werden. Ein Ansatz dafür wäre, die Vorläuferzellen mit einem nicht fluoreszierenden Farbstoff zu markieren oder alternativ unterschiedliche Antikörper-Klone zu testen, die nur an die eingewanderten Zellen binden, um diese dann in der Dermis oder Epidermis zu identifizieren.

4.2 Ursprung der Langerhans Zellen

Langerhans Zellen sind spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen, die in basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis lokalisiert sind (Jakob et al., 2001). Ihre Aktivierung führt zur Mobilisierung der Langerhans Zellen und zur Migration in Richtung der drainierenden Lymphknoten. Aber auch in der ruhenden Haut findet ein minimaler Austausch von Langerhans Zellen statt, da auch in Abwesenheit einer Entzündung Langerhans Zellen im Lymphknoten gefunden wurden (Kissenpfennig et al., 2005b). Die Mechanismen der Auswanderung der Langerhans Zellen in Richtung Lymphknoten ist schon in zahlreichen Untersuchungen betrachtet worden, hingegen gibt es zu der Einwanderung der Vorläuferzellen und der Ontogenie der Langerhans Zellen noch keinen Konsens. Es existieren zwei Hypothesen, die die Ontogenese der Langerhans Zellen beschreiben. Dies sind zum einen die Theorie des dermal lokalisierten Vorläufers, der γ -Strahlen resistent und für den Austausch der Langerhans Zellen in der nicht-entzündeten Haut verantwortlich ist (Merad et al., 2002). Zum anderen wurde die Theorie aufgestellt, dass CD14_{pos} DC, die in der Dermis lokalisiert sind, zu Langerhans Zellen differenzieren (Larregina et al., 2001). Unter inflammatorischen Bedingungen wurden Langerhans Zellen durch Zellen, die aus dem Knochenmark abstammen und myeloiden Ursprungs sind, ersetzt (Bogunovic et al., 2006). In den meisten *in vitro* Untersuchungen von humanen Langerhans Vorläuferzellen wurden entweder Monozyten, isoliert aus dem peripheren Blut, oder CD34_{pos} Stammzellen eingesetzt. Daher wurden in dieser Arbeit beide Zellarten eingesetzt, um die Immigration in die Haut zu untersuchen und die beiden Zellarten als potentielle Vorläufer für Langerhans Zellen zu vergleichen.

4.2.1 Monozyten als Langerhans Vorläuferzellen

Es ist hinlänglich bekannt, dass Monozyten aus mehreren Subpopulationen bestehen (Gordon and Taylor, 2005). Ebenso wird vermutet, dass diese Subpopulationen unterschiedlichen Effektorzellen als Vorläufer dienen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Monozyten konnten auf Grund der Höhe der CD14 Expression in zwei Subpopulationen unterteilt werden. CD14_{high} Monozyten zeichneten sich darin aus, die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR3 stärker als die CD14_{low} Monozyten auf der Oberfläche zu exprimieren. CD14_{low} Monozyten exprimierten dagegen den Chemokinrezeptor CX₃CR1 stärker auf ihrer Oberfläche als die CD14_{high} Monozyten, außerdem minimal CCR6. Diese Befunde belegen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten den bereits in der Literatur beschriebenen entsprechen. Es konnte sowohl im humanen System wie auch im Mausmodell gezeigt werden, dass CD14_{low} Monozyten, die den Fcγ-Rezeptor III (CD16) stärker als die CD14_{high} Zellen auf der Oberfläche exprimierten, *in vitro* besonders auf Fractalkine hin migrierten (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003). Die unterschiedliche Expression der Chemokinrezeptoren ist ein erster Hinweis auf eine unterschiedliche Determination der beiden Subpopulationen. Die Sezernierung der Liganden von CCR1, CCR2 und CCR3 durch diverse Zellen (Epithelzellen, Endothelzellen und diverse Gewebszellen) wird durch Aktivierung mit unterschiedlichsten Stimuli hochreguliert (Moser et al., 2004). Besonders der Chemokinrezeptor CCR2 scheint für die Immigration von Langerhans Vorläuferzellen aus dem Blut nach Entzündung eine besondere Rolle zu spielen. Schon die Auswanderung von Monozyten aus dem Knochenmark ist von CCR2 abhängig. In einer CCR2 defizienten Maus waren die inflammatorischen Monozyten nach Infektion mit *Listeria monozytogenes* nicht in der Lage, aus dem Knochenmark auszuwandern (Serbina and Pamer, 2006). Dass CCR2 ebenso wichtig bei der Repopulation der Langerhans Zellen in der Epidermis nach UV-Bestrahlung ist, zeigten die Ergebnisse in der CCR2 defizienten Maus (Merad et al., 2002).

Durch die hier gezeigten Ergebnisse wurden weiterführende Erkenntnisse zu der Expression und Regulation von CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Monozyten gewonnen. CCR2 wurde durch die Kultivierung zu DC unter Standardbedingung auf der Oberfläche der Monozyten herunterreguliert. Auch die Kultivierung der Monozyten ohne Zytokine führte zum Verlust von CCR2 auf der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden überein, in denen gezeigt werden konnten, dass die Differenzierung zu Makrophagen zum Verlust von CCR2 auf der Oberfläche der Monozyten führte (Fantuzzi et al., 1999; Phillips et al., 2005). Hingegen führte die Migration von CD14_{high} Monozyten auf FCM hin zur Stabilisierung der CCR2-Expression auf der Zelloberfläche. Die Bindung durch MCP-1 an

CCR2 konnte als ein dafür verantwortlicher Mechanismus identifiziert werden, da die Stabilisierung von CCR2 auf den migrierten Monozyten durch einen MCP-1 neutralisierenden Antikörper aufgehoben wurde. Weiterhin scheint gerade die Bindung des Liganden an den Rezeptor entscheidend für die Stabilisierung zu sein, wohingegen Kreuzvernetzung von CCR2 mit einem CCR2 spezifischen monoklonalen Antikörper ebenfalls zum Verlust des Rezeptors auf der Zelloberfläche führte, möglicherweise durch Internalisierung des Rezeptors. Neben CCR2 wird auch CCR6 als ein entscheidender Faktor bei der Repopulation der Epidermis nach Inflammation diskutiert. CCR6 ist der einzig bekannte Rezeptor für MIP-3 α , das konstitutiv von Keratinozyten exprimiert wird. Nach Aktivierung der Keratinozyten mit TNF- α wurde die MIP-3 α Produktion verstärkt (Schutyser et al., 2003). In Migrations-Experimenten, die *in vivo* durchgeführt wurden, migrierten Langerhans Vorläuferzellen, die aus CD34_{pos} Stammzellen generiert wurden, am stärksten auf MIP-3 α hin (Dieu-Nosjean et al., 2000; Godefroy et al., 2001). Monozyten und MoDC migrierten nicht auf MIP-3 α hin. Weiterhin exprimierten in diesen Experimenten MoDC kein CCR6. Diesen Ergebnissen widersprechen zum Teil die hier gezeigten Befunde. Monozyten migrierten ebenfalls nicht auf MIP-3 α hin, allerdings exprimierten MoDC an d7 CCR6 auf ihrer Oberfläche. Ob MoDC dadurch in der Lage wären, auf MIP-3 α hin zu migrieren, wurde nicht getestet.

Allgemein anerkannt ist, dass Langerhans Zellen und dermale CD14_{pos} Zellen CCR6 exprimieren (Dieu-Nosjean et al., 2000; Larregina et al., 2001). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sind die Ergebnisse der hier gezeigten sequentiellen Migration der CD14_{low} Monozyten von besonderer Bedeutung. Die Migration der CD14_{low} Monozyten in FCM hinein führte zur Differenzierung der Zellen in *bona fide* DC, definiert durch die Expression von CCR6 und noch entscheidender durch die Expression von CD1a. Dieser Befund unterstützt und erweitert die Ergebnisse von Randolph et al. (1998), die in einem Kultur-System die transendotheliale Migration von humanen Monozyten untersucht haben. Die meisten Monozyten differenzierten dabei zu Makrophagen, wobei besonders die CD16_{pos} Monozyten „revers transmigrierten“. Diese reverse Migration sollte die Auswanderung aus dem Gewebe in die Lymphgefäße nachahmen. Die revers transmigrierten Zellen hatten einen DC Phänotyp (Randolph et al., 2002; Randolph et al., 1998).

Die hier gezeigten Ergebnisse der sequenziellen Migration vertiefen die Befunde von Randolph et al.. Nach der ersten Migration in FCM exprimierten ein Teil der CD14_{low} Monozyten CD1a. Die zweite Migration der CD14_{low} Monozyten in KCM verstärkte die CD1a-Expression. CD14_{high} Monozyten exprimierten nach der ersten Migration in FCM hinein konstant CCR2 und migrierten spezifisch in der zweiten Migration in KCM. Hingegen

migrierten Monozyten, die nicht in FCM migriert waren, sondern als Kontrolle ohne Zytokine kultiviert wurden, nicht spezifisch in KCM hinein.

Diese hier gezeigten Ergebnisse führen zu der neuen in Abb.4.1 vorgestellten Theorie, dass besonders die CD14_{low} Monozyten als Vorläuferzellen der dermalen DC oder Langerhans Zellen dienen, wobei diese Differenzierung durch einen einzigen Vorgang induziert wird, nämlich die transendotheliale Migration in das dermale Kompartiment. Hingegen stellen die CD14_{high} Monozyten möglicherweise Vorläuferzellen sowohl für Makrophagen als auch DC dar, wobei die endgültige Differenzierung nicht durch die Immigration in die Dermis induziert wird, da diese Zellen auch nach Migration noch CCR2 exprimierten und auch noch auf Keratinozyten-spezifische Faktoren hin migrierten. Möglicherweise benötigen diese Zellen weitere Signale, um entweder zu Makrophagen oder DC zu differenzieren. Ein mögliches Signal könnte der interzelluläre Kontakt mit Fibroblasten darstellen, dieser wurde in dem hier durchgeführten Migrations-Experiment nicht untersucht.

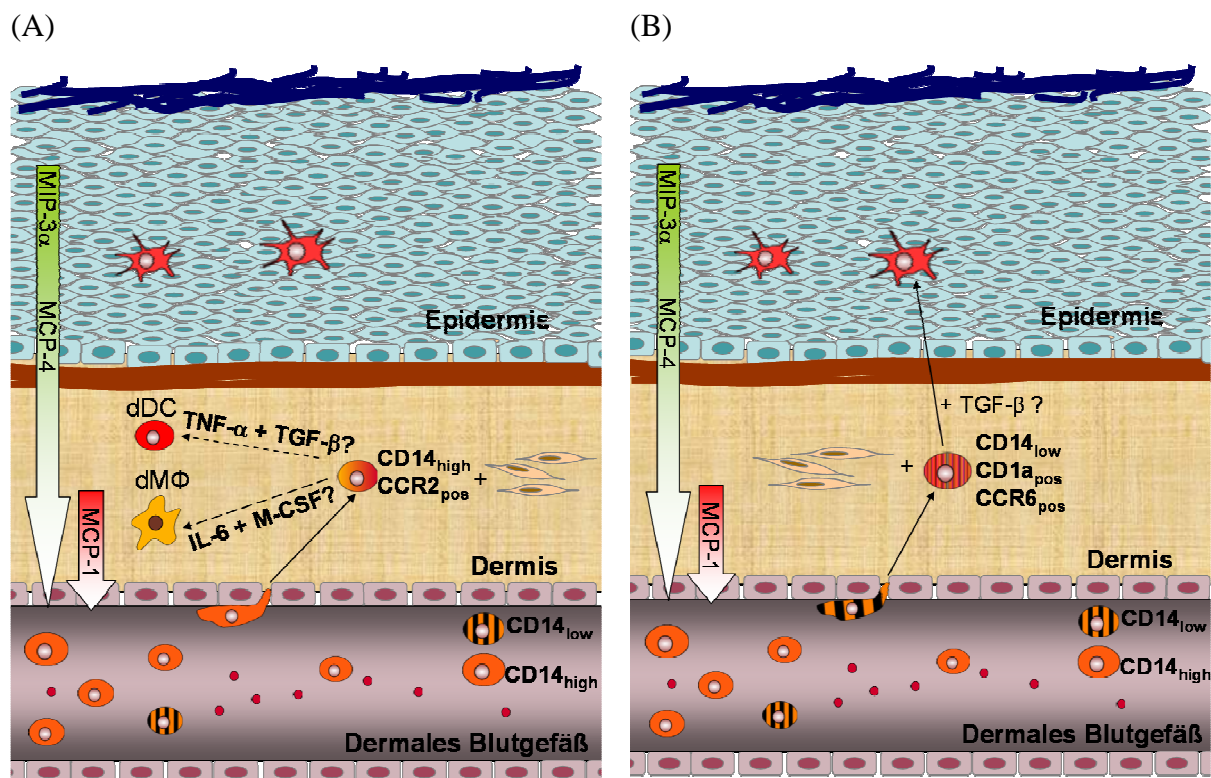


Abb.4.1 Modell für die Immigration der Monozyten-Subpopulationen in die Haut

(A) CD14_{high} Monozyten immigrieren in das dermale Kompartiment und könnten sowohl zu dermalen DC (dDC) oder zu dermalen Makrophagen (dM Φ) differenzieren. (B) CD14_{low} Monozyten immigrieren in die Dermis, wodurch sie direkt einen DC Phänotyp erlangen. Diese dermalen DC ähnlichen Zellen könnten die Vorläuferzellen für Langerhans Zellen darstellen.

Weitere Unterschiede zwischen den beiden Monozyten-Subpopulationen konnten bei der Expression des α -Integrins CD11b beobachtet werden. CD14_{high} Monozyten exprimierten

deutlich mehr CD11b Moleküle auf der Oberfläche als CD14_{low} Monozyten. CD11b wird ebenso wie das α -Integrin CD11a als Heterodimer mit dem β -Integrin CD18 auf der Zelloberfläche exprimiert. Beide Integrine sind für die feste Adhäsion von Vorläuferzellen an die Endothelzellen bei der Immigration in das Gewebe verantwortlich (Nguyen et al., 2002). Ob aus den unterschiedlich stark exprimierten Integrinen abgeleitet werden kann, dass die CD14_{low} Monozyten schlechter an Endothelzellen adhären können und somit schlechter in das Gewebe immigrieren können, kann nicht belegt werden, da keine Blockierungsexperimente durchgeführt wurden. Eindeutig war allerdings, dass die CD14_{low} Monozyten deutlich langsamer migrierten als die CD14_{high} Monozyten (nicht gezeigt). Dies könnte ein Hinweis auf die Rolle von CD11b bei der Immigration von Monozyten in die Haut sein.

Zusammenfassend kann für die Monozyten beschrieben werden, dass sie aus mindestens zwei großen Subpopulationen bestehen. Diese Subpopulationen werden von Fibroblastenspezifischen Faktoren und Endothelzellen unterschiedlich beeinflusst, was zu der Differenzierung der Subpopulationen in unterschiedliche Effektorzellen führt (Abb.4.1).

4.2.2 CD34DC als Langerhans Vorläuferzellen

Da bisher besonders aus CD34_{pos} Zellen generierte DC (CD34DC) als Modellsystem für die Untersuchung der Immigration humaner Langerhans Zellen eingesetzt wurden, soll in diesem Abschnitt auf den Einsatz dieser Zellen im Vergleich zu Monozyten eingegangen werden. Die in dieser Arbeit eingesetzten CD34DC konnten in vier Subpopulationen eingeteilt werden, entsprechend der Expression von CD14 und CD1a. Im Vergleich der CD14_{pos} CD34DC mit den Monozyten aus dem peripheren Blut zeigte sich, dass obwohl beide Zelltypen CCR2 exprimierten und auf FCM und MCP-1 hin migrierten, sie dennoch nicht identisch sind. CD14_{pos} CD34DC exprimierten sowohl an d4 wie auch an d7 CCR6 und nur sehr gering CCR1. Anders als Monozyten migrierte diese Subpopulation, wenn auch nur gering, spezifisch auf MIP-3 α hin.

Anders als bei den Monozyten gab es keine unterschiedlichen Subpopulationen innerhalb der CD14_{pos} CD34DC, daher können keine Aussagen über mögliche Determinierungen in Richtung Makrophagen oder DC innerhalb dieser Subpopulation gemacht werden. Allerdings wurde durch Zugabe von GM-CSF in den CD14_{pos} CD34DC die Expression von CD1a induziert. Daher kann gefolgert werden, dass CD14_{pos} Zellen eine Vorläuferpopulation für DC darstellen und sie unter den entsprechenden Bedingungen zu DC differenzieren.

Der DP Subpopulation scheint aufgrund ihrer die Expression von Langerin, CCR6 und E-Cadherin die Differenzierung in Langerhans Zellen vorgegeben zu sein. Ob sich DP Zellen in CD1a_{pos} CD34DC entwickeln können, konnte aufgrund von Zellmangel nach der Sortierung nicht untersucht werden. Die DP Zellen differenzierten durch Zugabe von GM-CSF aus den CD14_{pos} Zellen und den DP Zellen. Diese Differenzierung konnte auch beobachtet werden, wenn die CD34DC nach Migration in FCM weiterkultiviert wurden. Dieses Experiment wurde nicht gezeigt.

Die CD1a_{pos} CD34DC Population ähnelte Langerhans Zellen am stärksten. Es ist davon auszugehen, dass die CD1a_{pos} CD34DC einem Endstadium der Differenzierung entsprechen. Sie zeigten die schwächste Chemotaxis auf die konditionierten Medien und die getesteten Chemokine, was mit ihrer residenten Rolle in der Epidermis übereinstimmen würde.

Die Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens der CD34DC zeigten, dass MoDC und CD34DC beide an Laminin 332 und Fibronectin adhärirten, wobei mehr MoDC adhärirten. Diese Ergebnisse bestätigen schon veröffentlichte Untersuchungen, in denen die Adhäsion von aufgereinigten Langerhans Zellen an Proteine der ECM untersucht wurden. Dabei wurde allerdings an Stelle von Laminin 332 Laminin 111 eingesetzt, und die Adhäsion wurde im Zusammenhang mit der Auswanderung von Langerhans Zellen untersucht (Le Varlet B. et al., 1992).

Die Untersuchung der Expression der dafür verantwortlichen Adhäsionsmoleküle zeigte, dass sowohl CD34DC als auch MoDC die α -Integrine CD49d, CD49e und das β_1 -Integrin CD29 exprimierten. CD49e liegt als Heterodimer mit der β_1 -Integrin-Kette CD29 auf der Zelloberfläche vor und vermittelt wie auch das Heterodimer aus CD49d/CD29 die Bindung an Fibronectin.

Die Adhäsion an Laminin 332 wird durch die Integrine CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49f/CD29 und CD49f und dem β_4 -Integrin CD104 vermittelt (Delwel et al., 1994; Nishiuchi et al., 2006; Rousselle and Aumailley, 1994), wobei bei der Adhäsion von Keratinozyten an Laminin 5 das Heterodimer aus CD49f und CD29 eine untergeordnete Rolle spielte (Aumailley and Krieg, 1996).

Die mRNA der α -Integrine CD49b, CD49c und CD49f konnte sowohl in MoDC als auch für CD34DC nachgewiesen werden, jedoch nicht das Protein durch Durchflusszytometrie auf der Oberfläche (siehe Abschnitt 4.1). Obwohl MoDC und CD34DC das Integrin CD49b/CD29 exprimierten, das unter anderem die Bindung an Collagene vermittelt, konnte keine Adhäsion an Collagen I und Collagen IV beobachtet werden. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die zelluläre Umgebung sich auf die Bindungseigenschaften der Integrine

auswirken kann. Weiterhin werden die Aktivität und die damit verbundene Affinität zum Liganden durch intrazelluläre Signalwege beeinflusst, so dass in dem „OFF“-Zustand die Integrine nicht an ihre Liganden binden (Hynes, 2002). Diese Signalwege werden unter anderem durch die Bindung von Chemokinen an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche induziert (Shamri et al., 2005).

Der Phänotyp der adhären CD34DC im Hinblick auf die Expression von CD14 und CD1a suggeriert eine Hypothese zu der entsprechenden Lokalisierung der Zellen in der Haut (Abb.4.2). Da Laminin 332 ein Hauptbestandteil der Basalmembran zwischen der Dermis und der Keratinozyten ist und hauptsächlich CD14-positive CD34DC an Laminin 332 banden, ist es vorstellbar, dass diese Zellen Langerhans Vorläuferzellen entsprechen, die in dem oberen Bereich der Dermis lokalisiert sind. Sie werden z.B. durch Keratinozyten-spezifische Chemokine induziert, in die Epidermis zu immigrieren. Wiederum banden hauptsächlich CD1a-positive Zellen Fibronectin, das Hauptbestandteil des dermalen Kompartiments ist. Diese Zellen könnten dermalen DC entsprechen, die nach Aktivierung in die Lymphknoten einwandern. Diese Hypothese wird durch den Befund gestützt, dass aus der Haut aufgereinigte Langerhans Zellen nach Adhäsion an Fibronectin nicht mehr als möglicher Schutz vor der erneuten Immigration in die Epidermis an Proteine der Basalmembran adhären konnten (Staquet MJ 1995).

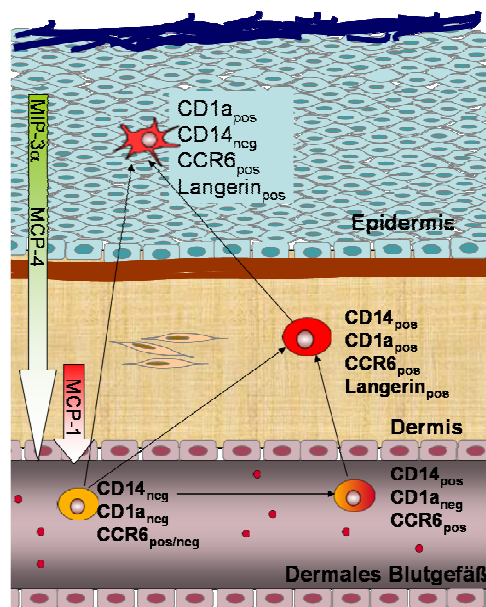


Abb.4.2 Modell der möglichen Lokalisierung der CD34DC Subpopulationen in der Haut

Zusammenfassend kann über den Einsatz der CD34DC als *in vitro* Modell für Langerhans Zellen gesagt werden, dass diese Zellen eine sehr heterogene Population darstellen, was sowohl den Phänotyp als auch die Funktion der Subpopulationen betrifft. Durch diese

Heterogenität ist es schwer, einzelne Differenzierungen zu analysieren und zu manifestieren, da der Übergang der Populationen in einander fließend ist. Weniger die Immigration der Vorläuferzellen lässt sich durch den Einsatz von CD34DC untersuchen, viel mehr können durch die Aufklärung der Ontogenese der vier Subpopulationen Rückschlüsse auf die Lokalisierung der jeweiligen Subpopulationen in der Haut gezogen werden. Abb.4.2 zeigt ein Schema der möglichen Lokalisierung der Subpopulationen in der Haut.

Ebenfalls muss bei allen Analysen der Stammzellcharakter der CD34DC berücksichtigt werden. Mögliche Veränderungen der prozentualen Verteilung der Subpopulationen können auch durch Proliferation entstehen.

Im Vergleich zu dem Einsatz von Monozyten als Vorläuferzellen muss ebenfalls die notwendige *in vitro* Vorkultivierung der CD34DC berücksichtigt werden, die nicht der *in vivo* Situation entsprechen könnte. Dies ist bei frisch aus dem Blut isolierten Monozyten nicht gegeben.

4.3 Rolle der einzelnen Kompartimente der Haut bei der Immigration von Vorläuferzellen

Bei der Immigration in die Epidermis werden die Langerhans Vorläuferzellen entlang eines Chemokin-Gradienten durch das Endothel und die Dermis geleitet. Die Chemokine werden von Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und residenten Langerhans Zellen synthetisiert (Kupper and Fuhlbrigge, 2004).

Während einer Entzündung existiert in der Haut ein anderes Zytokin- und Chemokin-Milieu, als es in der ruhenden Haut vorliegt. Manipulationen an der Epidermis, beispielsweise durch mechanische Reizung, haben direkte Auswirkung auf die Zytokinproduktion der anderen Kompartimente (Nickoloff and Naidu, 1994). Ebenso ändert sich das Chemokin-Milieu in der Haut, wodurch Leukozyten vermehrt in die Haut immigrieren (Kupper and Fuhlbrigge, 2004).

4.3.1 Funktion der Chemokine bei der Immigration der Vorläuferzellen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Immigration von Vorläuferzellen in die nicht entzündete Haut. Dafür wurde mit einem Chemokin-Array Test eine breitgefaste Analyse der Chemokine durchgeführt, die von unstimulierten Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten produziert wurden. Dieser Test zeigte, dass die meisten analysierten Chemokine von allen drei Zellsorten sezerniert wurden. Allerdings konnten auch zellspezifische Chemokine nachgewiesen werden. Endothelzellen sezernierten nur CCL28 (MEC) als spezifisches Chemokin, was bisher noch unbekannt war. Keratinozyten sezernierten spezifisch die Chemokine MCP-4 (CCL13), auch gezeigt von (Vanbervliet et al.,

2002), MDC (CCL22), auch gezeigt von (Fujii-Maeda et al., 2004), MIP-3 α (CCL20), auch gezeigt von (Dieu et al., 1998) und Ck β 8-1 (CCL23), was bislang noch nicht gezeigt wurde. Als Fibroblasten-spezifische Chemokine wurden TARC (CCL17) und IP-10 (CXCL10) nachgewiesen, wobei beide Chemokine nach anderen Analysen auch von Endothelzellen und Keratinozyten produziert wurden (Fujii-Maeda et al., 2004; Meissner et al., 2003; Oynebraten et al., 2004; Stoof et al., 2001).

Die konditionierten Medien wurden in Migrations-Experimenten eingesetzt, um die Chemotaxis der zwei verschiedenen Vorläufertypen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass Monozyten und CD34DC spezifisch in die konditionierten Medien hinein migrierten. Die Migration von Monozyten in FCM und ihre anschließende Kultivierung in diesem konditionierten Medium führte dazu, dass diese Monozyten in einer zweiten Migration auf KCM hin spezifisch migrierten. Hingegen waren Monozyten, die nicht in das FCM migriert waren, nicht in der Lage, spezifisch auf KCM hin zu migrieren. Daraus kann abgeleitet werden, dass nach Immigration der Monozyten in das dermale Milieu die Zellen weiterhin in der Lage sind, spezifisch auf Chemoattraktantien hin zu migrieren, die u. a. von Keratinozyten sezerniert wurden. Beispielsweise könnten die CD14_{low} Monozyten als Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis immigrieren.

Innerhalb der CD34DC migrierten die CD14_{pos} CD34DC am stärksten in FCM hinein. Als ein dafür verantwortliches Chemokin konnte MCP-1 identifiziert werden. MCP-1 wurde auch von Endothelzellen sezerniert und wirkte entscheidend bei der Wundheilung der Haut mit. MCP-1 defiziente Mäuse hatten eine deutlich verlangsamte Wundheilung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Low et al., 2001).

Als spezifisch aktives Chemokin für Monozyten und CD34DC konnte MCP-4 identifiziert werden, das nur von Keratinozyten sezerniert wurden. Allerdings wurde MCP-4 auch in aktivierten dermalen Fibroblasten nachgewiesen (Petering et al., 1998). Aktivierte dermale Fibroblasten sind in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden.

Die Neutralisierung von MCP-4 in KCM mit einem anti-MCP-1 Antikörper zeigte keine Inhibition der spezifischen Migration der DP CD34DC. Die Migration aller anderen Subpopulationen auf KCM hin wurde teilweise inhibiert.

Ein besonders interessantes Ergebnis, wenn auch nur aus einem einmal durchgeführten Experiment, ergab die Migration von Monozyten auf MCP-4 hin und die anschließende Weiterkultivierung der migrierten Zellen in MCP-4; diese Behandlung induzierte auf den CD14_{low} Monozyten CCR6. MCP-4 induzierte allerdings deutlich weniger CCR6 auf den CD14_{low} Monozyten als Fibroblasten-spezifische Faktoren. Darüber hinaus wurde durch

MCP-4 keine CD1a-Expression induziert. Die Wirkung von MCP-4 auf CD14_{low} Monozyten scheint ein Beispiel für die Rolle der Epidermis bei der Rekrutierung von Langerhans Vorläuferzellen darzustellen. Durch Sezernierung chemoattraktiver Substanzen durch Keratinozyten entsteht ein Chemokin-Gradient, der bis in die dermalen Blutgefäße reicht. Die im Blut transportierten Monozyten werden spezifisch angeregt, entlang dieses Gradienten in die Haut zu immigrieren, wodurch gerade CD14_{low} Monozyten induziert werden, weitere wichtige Rezeptoren, wie CCR6, für die Immigration in die Epidermis zu exprimieren.

Die Migration auf MIP-3 α hin, als bekanntestes für die Immigration verantwortliches Chemokin, war gering bei den CD34⁺DC. Dieses Ergebnis bestätigt bereits von anderen Gruppen gezeigte Befunde (Dieu-Nosjean et al., 2000). Allerdings sollten die CD34⁺DC, die den Chemokinrezeptor für MIP-3 α CCR6 deutlich exprimierten, auf MIP-3 α hin stärker migrieren. Ein möglicher Grund für diese schwächere Antwort der CD34⁺DC kann an dem Aufbau des hier durchgeführten Experimentes liegen. Die CD34⁺DC mussten durch eine Endothelzellschicht auf MIP-3 α zu migrieren. Möglicherweise wurde durch die Endothelzellen die spezifische Migration auf MIP-3 α hin verlangsamt. In den Experimenten von Godefroy et. al. (2001) mussten die CD34⁺DC nur durch Matrigel™ auf MIP-3 α zu migrieren. Weiterhin wurde in diesen Experimenten noch TGF- β 1 als zusätzlicher chemoattraktiver Faktor zu MIP-3 α gegeben, was die Migration der CD34⁺DC deutlich verstärkte (Godefroy et al., 2001).

In diesem Zusammenhang ist eine Hypothese von Vanbervliet et al. (2002) interessant. Um die spezifische Antwort von CD14_{pos} CD34⁺DC auf MIP-3 α zu induzieren, muss zuvor eine Antwort auf MCP-4 vorangegangen sein (Vanbervliet et al., 2002). Diese Hypothese wird zwar nicht genau durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt, da auch die CD14_{pos} CD34⁺DC auf MIP-3 α hin migrierten. Aber für die Immigration der Monozyten in die Epidermis könnte die Hypothese zutreffen. Durch die Expression von CCR6 auf den CD14_{low} Monozyten nach der Migration auf FCM oder MCP-4 hin könnten diese spezifisch auf MIP-3 α hin migrieren. Dies müsste durch sequenzielle Migrations-Experimente geklärt werden, indem nach transendothelialer Migration auf FCM oder MCP-4 hin die Migration auf MIP-3 α hin untersucht werden würde.

4.3.2 Für die Differenzierung der Vorläuferzellen verantwortliche Fibroblastenspezifische Zytokine

Wie schon weiter oben beschrieben, führte die Kultivierung der CD14_{low} Monozyten in FCM zur Differenzierung in *bona fide* DC. Die Untersuchung des FCM auf mögliche

Differenzierungsfaktoren zeigte, dass von den Fibroblasten TGF- β 1 in relevanten Mengen sezerniert wurde, nicht aber GM-CSF. Dies erklärt die Differenzierung der CD14_{low} Monozyten nur zum Teil, da gerade GM-CSF für die Induktion von CD1a auf Monozyten nötig ist (Athanasas-Platsis et al., 1995). Als ein alternatives Zytokin für die Differenzierung kann M-CSF benannt werden, das in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Mäuse, die den Rezeptor für M-CSF CD115 (CSF-1R) nicht exprimieren konnten, hatten keine Langerhans Zellen in der Epidermis, die im ruhenden Zustand war. Ebenso waren haematopoetische Stammzellen, die CD115 defizient waren, nicht in der Lage, die entzündete Haut mit Langerhans Zellen zu repopularisieren (Ginhoux et al., 2006). Ebenso konnten humane CD34_{pos} Stammzellen unter Einfluss von M-CSF in CD14_{pos} dermale DC-ähnliche Zellen differenzieren, die unter anderem DC-SIGN exprimierten. Wurden diese Zellen mit TGF- β 1 und GM-CSF weiterkultiviert, begannen sie Langerin, CD1a und CCR6 zu exprimieren, um so in Langerhans Zellen-ähnliche Zellen zu differenzieren (Barbaroux et al., 2006). Ob M-CSF von Fibroblasten sezerniert wurde und ob es zusammen mit TGF- β 1 die Differenzierung der CD14_{low} Monozyten in DC induziert, muss noch geklärt werden. Hierfür könnte zunächst ein M-CSF spezifischer ELISA durchgeführt werden und anschließend versucht werden, mit monoklonalen Antikörpern gegen TGF- β 1 und/oder M-CSF die Differenzierung der CD14_{low} Zellen zu inhibieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch intradermale Injektion von IL-10 ein postmigratorischer Wechsel der dermalen DC zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp induziert wurden. Hingegen konnte die Zugabe von IL-4 und GM-CSF diese Entwicklung inhibieren (de Gruijl et al., 2006).

Dass von Fibroblasten möglicherweise die entscheidenden Differenzierungsimpulse ausgehen, bestätigen die Ergebnisse von Mollah et al. (2002), in denen humane CD34_{pos} Stammzellen mit unterschiedlichen dermalen Fibroblasten-Zelllinien co-kultiviert wurden. Nach drei Wochen ohne exogene Zytokine hatten sich dermale DC-ähnliche Zellen entwickelt, die ca. 55% CD14_{pos}CD1a_{neg} und ca. 14% CD1a_{pos} waren (Mollah et al., 2002). Hingegen zeigten Chomarat et al. (2000), dass Fibroblasten nach dem Kontakt mit Monozyten IL-6 sezernierten. IL-6 wiederum verstärkte die Expression von M-CSF Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten. Das Zusammenspiel von IL-6 und M-CSF führte zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Chomarat et al., 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass trotz der Anwesenheit von Fibroblasten Monozyten unter Einfluss von TNF- α in DC differenzierten (Chomarat et al., 2003).

Welche Faktoren unter welchen Bedingungen letztendlich die Differenzierung der Monozyten induziert, bleibt dennoch noch zu klären, vor allem, weil innerhalb der Monozyten die Subpopulationen unterschiedlich von den Zytokinen und Fibroblasten beeinflusst werden könnten.

4.3.3 Rolle des Endothels bei der Immigration der Vorläuferzellen

Die dermalen Endothelzellen erfordern den ersten Kontakt der Vorläuferzellen bei ihrer Emigration aus den Blutgefäßen. Durch die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen bremsen sie die Vorläuferzellen im Blut ab. Durch Wechselwirkungen mit Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen können die Vorläuferzellen entlang der Endothelzellen in die Dermis immigrieren. Aus diesen Schritten wurde die Frage abgeleitet, wie Monozyten und CD34⁺DC durch transendotheliale Migration auf chemoattraktive Faktoren von Fibroblasten oder Keratinozyten hin beeinflusst werden und ob Differenzierungen der Vorläuferzellen von dem interzellulären Kontakt mit den Endothelzellen abhängig sind.

Es zeigte sich, dass für beide Vorläuferzellarten der Kontakt mit dem Endothel entscheidend war.

Endothelzellen und CD34⁺DC

Die spezifische Migration der CD34⁺DC in KCM hinein wurde durch das Endothel verstärkt. Mögliche Gründe dafür könnten die auf den Endothelzellen gebundenen Chemokine sein, die zur verstärkten spezifischen Migration auf Keratinozyten-spezifische Chemokine hin beitragen. Fractalkine wird zum Beispiel konstitutiv von den Endothelzellen exprimiert, wodurch Adhäsion und Immigration von Zellen induziert werden, die den CX₃CR1 Rezeptor exprimieren. CX₃CR1 mRNA wurde in den CD34⁺DC nachgewiesen. Fractalkine übt eine duale Funktion auf die Vorläuferzellen aus, in dem sie durch Membran-gebundenes Fractalkine an die Endothelzellen adhärieren und durch gelöstes Fractalkine Chemotaxis induziert wird (Geissmann et al., 2003). Ein weiteres Chemokin, das die Immigration von Leukozyten induziert, ist an Endothelzellen gebundenes MIP-1 β (CCL4) (Tanaka et al., 1993), das unter anderem von CCR1 erkannt wird. Weiterhin ist es vorstellbar, dass die Endothelzellen durch Keratinozyten-spezifische Faktoren beeinflusst werden, das Repertoire gebundener Chemokine und besonders Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche zu verändern. Außer Chemokin-vermittelter spezifische Migration könnten auch durch Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle die Spezifität der Migration von CD34⁺DC beeinflussen, indem nur solche Zellen transmigrieren können, die die entscheidenden Adhäsionsmoleküle

exprimieren. Ein sehr wichtiges Molekül für die Diapedese ist CD31 (PECAM-1). Allerdings konnten keine Unterschiede bei der Expression von CD31 zwischen den Subpopulationen der CD34⁺DC festgestellt werden (nicht gezeigt). Wahrscheinlich sind daher andere Adhäsionsmoleküle für die Selektivität der transendothelialen Migration der CD34⁺DC verantwortlich, beispielsweise die Familie der JAM-Moleküle, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Endothelzellen und Monozyten

Migration und Differenzierung von Monozyten wurden ebenfalls wesentlich durch den Kontakt mit den Endothelzellen beeinflusst. Die spontane Migration auf FCM hin nahm durch die Beschichtung der Membran mit Endothelzellen zu. Als Erklärung hierfür kann das besonders starke Adhäsionsverhalten der Monozyten herangezogen werden. Monozyten adhären besonders schnell an Plastikoberflächen, was unter anderem zu der Differenzierung zu Makrophagen führen kann.

Da durch Endothelzellen die Migration der Monozyten in FCM hinein verstärkt wurde, ist davon auszugehen, dass direkte Bindungspartner benötigt werden, um die Migration von Monozyten zu induzieren. Mögliche Bindungspartner könnten CD31 (PECAM-1) oder CD99 sein. Die Funktion dieser beiden Moleküle bei der transendothelialen Migration von Monozyten konnten in Blockierungsexperimenten identifiziert werden (Liao et al., 1997; Schenkel et al., 2002).

Endothelzellen übten auch entscheidende Funktionen bei der Differenzierung der Monozyten aus. Nach transendothelialer Migration in FCM hinein exprimierten deutlich mehr CD14_{low} Monozyten CCR6 als bei der Migration durch die unbeschichtete Membran. Nach transendothelialer Migration waren wiederum weniger CD14_{low} Monozyten CD1a-positiv als bei der Migration durch die unbeschichtete Membran. Nur die Migration durch Endothelzellen in FCM hinein führte dazu, dass CD14_{low} Monozyten zu dermalen DC-ähnlichen Zellen differenzierten, definiert durch die Expression von CCR6 und CD1a.

Die transendotheliale Migration von CD14_{high} Monozyten verstärkte die Wirkung von Fibroblasten-spezifischen Faktoren, CCR2 auf der Oberfläche der CD14_{high} Monozyten zu stabilisieren.

Endothelzellen wirken somit entscheidend bei den Differenzierungsvorgängen der beiden Monozyten-Subpopulationen mit, die für die spezifische Migration in KCM nach vorangegangener Migration in FCM hinein verantwortlich gemacht werden können.

4.4 Ein *in vitro* Hautmodell

Gewebemodelle werden unter anderem deswegen entwickelt, um funktionelle Analysen durchführen zu können, die nicht in einem Tiermodell untersucht werden können oder um Untersuchungssysteme der *in vivo* Situation anzunähern. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Hautmodell etabliert, das die drei Komponenten Endothelzellen, dermale Matrix und Keratinozyten zusammenbringen sollte. In diesem Hautmodell sollte die Immigration von Langerhans Vorläuferzellen in die Epidermis untersucht werden. In anderen Hautmodellen wurden bereits die Langerhans Zellen analysiert, wobei diesen Hautmodellen andere Fragestellungen zugrunde lagen als den hier gestellten. Das von Prunieras et al. (1983) etablierte Hautmodell besteht aus zwei Kompartimenten, der dermalen Matrix und der Epidermis (Prunieras et al., 1983). Die Fragen, die in diesem System untersucht wurden, befassten sich unter anderem auch mit der Popularisierung der Epidermis mit Langerhans Zellen, aber nicht mit deren Einwanderung. Dafür wurden CD34DC auf die bereits gewachsene Epidermis oder zusammen mit den Keratinozyten auf die DED gegeben, in beiden Fällen entstand eine Epidermis, in denen Langerhans Zellen nachgewiesen werden konnten (Regnier et al., 1998).

Das hier etablierte Modell sollte weniger die Frage klären, ob Langerhans Zellen eine rekonstituierte Epidermis besiedeln können, viel mehr lag das Zusammenspiel der einzelnen Kompartimente bei der Immigration potentieller Vorläuferzellen in die Epidermis im Focus des Interesses. Dafür musste zunächst die dritte Komponente in Form der Endothelzellen auf die 2-K-Haut appliziert werden. Dabei stellte es sich heraus, dass für die Endothelzellen ein passendes Substrat vorhanden sein musste, an das sie adhäreren konnten. Dieses Substrat war Matrigel™, was die vaskuläre Basalmembran zu imitieren schien.

Da der Weg der Langerhans Vorläuferzellen aus dem Blut in die Epidermis untersucht werden sollte, wurden die Vorläuferzellen auf die endotheliale Seite der 3-K-Haut gegeben. In ersten Versuchen schien es, dass nur CD34DC in die unteren Bereich der 3-K-Haut immigrierten, hingegen schienen Monozyten nur an der Endothelzellschicht zu adhäreren. Da diese Experimente nicht eindeutig ausgewertet werden konnten, sind mögliche Erklärungen für diese beiden Befunde nur spekulativ. In diesem Hautmodell fehlten komplett Fibroblastenspezifische Chemokine. Wahrscheinlich benötigen gerade Monozyten diese Faktoren, um in ein Hautmodell immigrieren zu können. Diese Erklärung widerspricht allerdings Befunden, dass Monozyten in Co-Kultur mit Endothelzellen innerhalb von 1h an die Endothelzellen banden und in die subendotheliale Collagen-Matrix traversierten, in der sich keinerlei Chemokine befanden (Randolph et al., 1998). Um diesen Widerspruch aufzuklären, müssten

Kinetik-Experimente durchgeführt werden, in denen die Immigration von Monozyten nach unterschiedlichen Zeiten untersucht werden würde. In dem hier beschriebenen Experiment wurden die 3-K-Häute nach 48h fixiert, möglicherweise waren die immigrierten Monozyten zu CD14-negativen Zellen differenziert, weshalb die Färbung gegen CD14 sie nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Fixierungen nach kürzen Immigrationszeiten würden möglicherweise den Verlauf der Differenzierung dieser Monozyten aufklären.

Insgesamt sind die Ergebnisse aus den funktionellen Untersuchungen in der 3-K-Haut noch sehr vorläufig. Nach der Lösung der technischen Probleme (siehe Abschnitt 4.1) könnten jedoch Migrations-Experimente in der 3-K-Haut neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Immigration von Langerhans Zellen in die Epidermis gewonnen werden.

5 Literatur

Allan, R.S., C.M.Smith, G.T.Belz, A.L.van Lint, L.M.Wakim, W.R.Heath, and F.R.Carbone. 2003. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301:1925-1928.

Ancuta, P., R.Rao, A.Moses, A.Mehle, S.K.Shaw, F.W.Luscinskas, and D.Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* 197:1701-1707.

Athanasas-Platsis, S., N.W.Savage, T.A.Winning, and L.J.Walsh. 1995. Induction of the CD1a Langerhans cell marker on human monocytes. *Arch. Oral Biol.* 40:157-160.

Aumailley, M. and T.Krieg. 1996. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J Invest Dermatol.* 106:209-214.

Barbaroux, J.B., W.H.Kwan, J.P.Allam, N.Novak, T.Bieber, W.H.Fridman, R.Groves, and C.G.Mueller. 2006. Tumor necrosis factor-alpha- and IL-4-independent development of Langerhans cell-like dendritic cells from M-CSF-conditioned precursors. *J Invest Dermatol.* 126:114-120.

Berman, A.E., N.I.Kozlova, and G.E.Morozevich. 2003. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc.)* 68:1284-1299.

Bogunovic, M., F.Ginhoux, A.Wagers, M.Loubeau, L.M.Isola, L.Lubrano, V.Najfeld, R.G.Phelps, C.Grosskreutz, E.Scigliano, P.S.Frenette, and M.Merad. 2006. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp. Med.* 203:2627-2638.

Borkowski, T.A., J.J.Letterio, A.G.Farr, and M.C.Udey. 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp. Med.* 184:2417-2422.

Bosman, F.T. and I.Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200:423-428.

Burns, S., S.J.Hardy, J.Buddle, K.L.Yong, G.E.Jones, and A.J.Thrasher. 2004. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57:118-132.

Carman, C.V. and T.A.Springer. 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:547-556.

Caux, C., C.Dezutter-Dambuyant, D.Schmitt, and J.Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.

- Chomarat, P., J.Banchereau, J.Davoust, and A.K.Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol* 1:510-514.
- Chomarat, P., C.Dantin, L.Bennett, J.Banchereau, and A.K.Palucka. 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol* 171:2262-2269.
- de Gruijl, T.D., C.C.Sombroek, S.M.Lougheed, D.Oosterhoff, J.Buter, A.J.van den Eertwegh, R.J.Scheper, and H.M.Pinedo. 2006. A postmigrational switch among skin-derived dendritic cells to a macrophage-like phenotype is predetermined by the intracutaneous cytokine balance. *J Immunol* 176:7232-7242.
- Delwel, G.O., A.A.de Melker, F.Hogervorst, L.H.Jaspars, D.L.Fles, I.Kuikman, A.Lindblom, M.Paulsson, R.Timpl, and A.Sonnenberg. 1994. Distinct and overlapping ligand specificities of the alpha 3A beta 1 and alpha 6A beta 1 integrins: recognition of laminin isoforms. *Mol. Biol. Cell* 5:203-215.
- Dieu, M.C., B.Vanbervliet, A.Vicari, J.M.Bridon, E.Oldham, S.it-Yahia, F.Briere, A.Zlotnik, S.Lebecque, and C.Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp. Med.* 188:373-386.
- Dieu-Nosjean, M.C., C.Massacrier, B.Homey, B.Vanbervliet, J.J.Pin, A.Vicari, S.Lebecque, C.Dezutter-Dambuyant, D.Schmitt, A.Zlotnik, and C.Caux. 2000. Macrophage Inflammatory Protein 3{alpha} is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192:705-718.
- Dupasquier, M., P.Stoitzner, O.A.van, N.Romani, and P.J.Leenen. 2004. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol.* 123:876-879.
- Ebnet, K., A.Suzuki, S.Ohno, and D.Vestweber. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 117:19-29.
- Elkhal, A., L.Tunggal, and M.Aumailley. 2004. Fibroblasts contribute to the deposition of laminin 5 in the extracellular matrix. *Exp. Cell Res.* 296:223-230.
- Fantuzzi, L., P.Borghi, V.Ciulli, G.Pavlakis, F.Belardelli, and S.Gessani. 1999. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 94:875-883.
- Ferrero, E., A.Bondanza, B.E.Leone, S.Manici, A.Poggi, and M.R.Zocchi. 1998. CD14+CD34+ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells. *J Immunol* 160:2675-2683.
- Figdor, C.G., K.Y.van, and G.J.Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol* 2:77-84.

Flacher, V., M.Bouschbacher, E.Verronese, C.Massacrier, V.Sisirak, O.Berthier-Vergnes, B.de Saint-Vis, C.Caux, C.Dezutter-Dambuyant, S.Lebecque, and J.Valladeau. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and gram-positive bacteria. *J Immunol* 177:7959-7967.

Fujii-Maeda, S., K.Kajiwara, K.Ikizawa, M.Shinazawa, B.Yu, T.Koga, M.Furue, and Y.Yanagihara. 2004. Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol.* 122:20-28.

Fujita, H., A.Asahina, H.Mitsui, and K.Tamaki. 2004. Langerhans cells exhibit low responsiveness to double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:832-839.

Geijtenbeek, T.B., D.J.Krooshoop, D.A.Bleijs, S.J.van Vliet, G.C.van Duijnhoven, V.Grabovsky, R.Alon, C.G.Figdor, and K.Y.van. 2000a. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol* 1:353-357.

Geijtenbeek, T.B., R.Torensma, S.J.van Vliet, G.C.van Duijnhoven, G.J.Adema, K.Y.van, and C.G.Figdor. 2000b. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.

Geissmann, F., S.Jung, and D.R.Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71-82.

Geissmann, F., C.Prost, J.P.Monnet, M.Dy, N.Brousse, and O.Hermine. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp. Med.* 187:961-966.

Ginhoux, F., F.Tacke, V.Angeli, M.Bogunovic, M.Loubeau, X.M.Dai, E.R.Stanley, G.J.Randolph, and M.Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol* 7:265-273.

Godefroy, S., G.Guironnet, C.Jacquet, D.Schmitt, and M.J.Staquet. 2001. A combination of MIP-3alpha and TGF-beta1 is required for the attraction of human Langerhans precursor cells through a dermal-epidermal barrier. *Eur. J Cell Biol.* 80:335-340.

Gordon, S. and P.R.Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol* 5:953-964.

Grabovsky, V., S.Feigelson, C.Chen, D.A.Bleijs, A.Peled, G.Cinamon, F.Baleux, F.Arenzana-Seisdedos, T.Lapidot, K.Y.van, R.R.Lobb, and R.Alon. 2000. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp. Med.* 192:495-506.

- Grage-Griebenow, E., H.D.Flad, and M.Ernst. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc. Biol.* 69:11-20.
- Gruschwitz, M.S. and O.P.Hornstein. 1992. Expression of transforming growth factor type beta on human epidermal dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 99:114-116.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
- Hamacher, S., S.Matern, and E.Roeb. 2004. [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 129:1976-1980.
- Headington, J.T. 1986. The dermal dendrocyte. *Adv. Dermatol.* 1:159-171.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.
- Hynes, R.O. and K.M.Yamada. 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 95:369-377.
- Imhof, B.A. and M.Aurrand-Lions. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol* 4:432-444.
- Ito, T., M.Inaba, K.Inaba, J.Toki, S.Sogo, T.Iguchi, Y.Adachi, K.Yamaguchi, R.Amakawa, J.Valladeau, S.Saeland, S.Fukuhara, and S.Ikehara. 1999. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163:1409-1419.
- Jakob, T., J.Ring, and M.C.Udey. 2001. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J Allergy Clin. Immunol* 108:688-696.
- Kanitakis, J., P.Petruzzo, and J.M.Dubernard. 2004. Turnover of epidermal Langerhans' cells. *N. Engl. J Med.* 351:2661-2662.
- Katz, S.I., K.Tamaki, and D.H.Sachs. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326.
- Kim, C.H. 2004. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 4:343-361.
- Kimber, I., M.Cumberbatch, R.J.Dearman, M.Bhushan, and C.E.Griffiths. 2000. Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *Br. J Dermatol.* 142:401-412.
- Kissenpfennig, A., S.Ait-Yahia, V.Clair-Moninot, H.Stossel, E.Badell, Y.Bordat, J.L.Pooley, T.Lang, E.Prina, I.Coste, O.Gresser, T.Renno, N.Winter, G.Milon, K.Shortman, N.Romani, S.Lebecque, B.Malissen, S.Saeland, and P.Douillard. 2005a. Disruption of the

langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol. Cell Biol.* 25:88-99.

Kissenpfennig, A., S.Henri, B.Dubois, C.Laplace-Builhe, P.Perrin, N.Romani, C.H.Tripp, P.Douillard, L.Leserman, D.Kaiserlian, S.Saeland, J.Davoust, and B.Malissen. 2005b. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 22:643-654.

Koch, S., K.Kohl, E.Klein, B.D.von, and T.Bieber. 2006. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin. Immunol* 117:163-168.

Kupper, T.S. and R.C.Fuhlbrigge. 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol* 4:211-222.

Larregina, A.T., A.E.Morelli, L.A.Spencer, A.J.Logar, S.C.Watkins, A.W.Thomson, and L.D.Falo, Jr. 2001. Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat. Immunol* 2:1151-1158.

Le Varlet B., M.J.Staquet, C.Dezutter-Dambuyant, P.Delorme, and D.Schmitt. 1992. In vitro adhesion of human epidermal Langerhans cells to laminin and fibronectin occurs through beta 1 integrin receptors. *J Leukoc. Biol.* 51:415-420.

Liao, F., J.Ali, T.Greene, and W.A.Muller. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp. Med.* 185:1349-1357.

Low, Q.E., I.A.Druege, L.A.Duffner, D.G.Quinn, D.N.Cook, B.J.Rollins, E.J.Kovacs, and L.A.DiPietro. 2001. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am. J Pathol.* 159:457-463.

Mamdouh, Z., X.Chen, L.M.Pierini, F.R.Maxfield, and W.A.Muller. 2003. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 421:748-753.

Martin-Padura, I., S.Lostaglio, M.Schneemann, L.Williams, M.Romano, P.Fruscella, C.Panzeri, A.Stoppacciaro, L.Ruco, A.Villa, D.Simmons, and E.Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142:117-127.

Mazzone, A. and G.Ricevuti. 1995. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80:161-175.

Mazzoni, A. and D.M.Segal. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc. Biol.* 75:721-730.

Meissner, A., O.Zilles, R.Varona, K.Jozefowski, U.Ritter, G.Marquez, R.Hallmann, and H.Korner. 2003. CC chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive B cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood* 102:2724-2727.

- Merad, M., P.Hoffmann, E.Ranheim, S.Slaymaker, M.G.Manz, S.A.Lira, I.Charo, D.N.Cook, I.L.Weissman, S.Strober, and E.G.Engleman. 2004. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 10:510-517.
- Merad, M., M.G.Manz, H.Karsunky, A.Wagers, W.Peters, I.Charo, I.L.Weissman, J.G.Cyster, and E.G.Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol* 3:1135-1141.
- Mizumoto, N. and A.Takashima. 2004. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. *J. Clin. Invest.* 113:658-660.
- Mohamadzadeh, M., F.Berard, G.ESSERT, C.Chalouni, B.Pulendran, J.Davoust, G.Bridges, A.K.Palucka, and J.Banchereau. 2001. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp. Med.* 194:1013-1020.
- Mollah, Z.U., S.Aiba, H.Manome, Y.Yoshino, and H.Tagami. 2002. Cord blood CD34+ cells differentiate into dermal dendritic cells in co-culture with cutaneous fibroblasts or stromal cells. *J Invest Dermatol.* 118:450-460.
- Mollah, Z.U., S.Aiba, S.Nakagawa, M.Hara, H.Manome, M.Mizuashi, T.Ohtani, Y.Yoshino, and H.Tagami. 2003. Macrophage colony-stimulating factor in cooperation with transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells into Langerhans cells under serum-free conditions without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Invest Dermatol.* 120:256-265.
- Moser, B., M.Wolf, A.Walz, and P.Loetscher. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25:75-84.
- Muller, W.A. 2001. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp. Med.* 194:F47-F51.
- Nguyen, V.A., S.Ebner, C.Furhapter, N.Romani, D.Kolle, P.Fritsch, and N.Sepp. 2002. Adhesion of dendritic cells derived from CD34+ progenitors to resting human dermal microvascular endothelial cells is down-regulated upon maturation and partially depends on CD11a-CD18, CD11b-CD18 and CD36. *Eur. J Immunol* 32:3638-3650.
- Nickoloff, B.J. and Y.Naidu. 1994. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am. Acad. Dermatol.* 30:535-546.
- Nishiuchi, R., J.Takagi, M.Hayashi, H.Ido, Y.Yagi, N.Sanzen, T.Tsuji, M.Yamada, and K.Sekiguchi. 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol.* 25:189-197.
- Nourshargh, S. and F.M.Marelli-Berg. 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 26:157-165.

- Oynebraten, I., O.Bakke, P.Brandtzaeg, F.E.Johansen, and G.Haraldsen. 2004. Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood* 104:314-320.
- Perreault, C., M.Pelletier, D.Landry, and M.Gyger. 1984. Study of Langerhans cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 63:807-811.
- Petering, H., R.Hochstetter, D.Kimmig, R.Smolarski, A.Kapp, and J.Elsner. 1998. Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *J Immunol* 160:555-558.
- Phillips, R.J., M.Lutz, and B.Premack. 2005. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm. (Lond)* 2:14.
- Prunieras, M., M.Regnier, and D.Woodley. 1983. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 81:28s-33s.
- Randolph, G.J., G.Sanchez-Schmitz, R.M.Liebman, and K.Schakel. 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp. Med.* 196:517-527.
- Randolph, G.J., S.Beaulieu, S.Lebecque, R.M.Steinman, and W.A.Muller. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483.
- Regnier, M., A.Patwardhan, A.Scheynius, and R.Schmidt. 1998. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med. Biol. Eng Comput.* 36:821-824.
- Regnier, M., M.J.Staquet, D.Schmitt, and R.Schmidt. 1997. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol.* 109:510-512.
- Reymond, N., A.M.Imbert, E.Devillard, S.Fabre, C.Chabannon, L.Xerri, C.Farnarier, C.Cantoni, C.Bottino, A.Moretta, P.Dubreuil, and M.Lopez. 2004. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J. Exp. Med.* 199:1331-1341.
- Romberger, D.J. 1997. Fibronectin. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 29:939-943.
- Rossi, D. and A.Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol* 18:217-242.
- Rousselle, P. and M.Aumailley. 1994. Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol.* 125:205-214.

Rousselle, P., G.P.Lunstrum, D.R.Keene, and R.E.Burgeson. 1991. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol.* 114:567-576.

Sallusto, F. and A.Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp. Med.* 179:1109-1118.

Sanchez-Torres, C., G.S.Garcia-Romo, M.A.Cornejo-Cortes, A.Rivas-Carvalho, and G.Sanchez-Schmitz. 2001. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int. Immunol* 13:1571-1581.

Schaerli, P., K.Willmann, L.M.Ebert, A.Walz, and B.Moser. 2005. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity.* 23:331-342.

Schenkel, A.R., Z.Mamdouh, X.Chen, R.M.Liebman, and W.A.Muller. 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol* 3:143-150.

Schneider, H., C.Muhle, and F.Pacho. 2006. Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur. J Cell Biol.*

Schoen, M.P., T.M.Zollner, and W.-H.Boehncke. 2003. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *Journal of Investigative Dermatology* 121:951-962.

Schutysse, E., S.Struyf, and D.J.Van. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:409-426.

Schwarzenberger, K. and M.C.Udey. 1996. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J Invest Dermatol.* 106:553-558.

Scimone, M.L., V.P.Lutzky, S.I.Zittermann, P.Maffia, C.Jancic, F.Buzzola, A.C.Issekutz, and H.E.Chuluyan. 2005. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* 114:375-385.

Serbina, N.V. and E.G.Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol* 7:311-317.

Shamri, R., V.Grabovsky, J.M.Gauguet, S.Feigelson, E.Manevich, W.Kolanus, M.K.Robinson, D.E.Staunton, U.H.von Andrian, and R.Alon. 2005. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol* 6:497-506.

Shortman, K. and S.H.Naik. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol* 7:19-30.

Sivard, P., C.Dezutter-Dambuyant, J.Kanitakis, J.F.Mosnier, H.Hamzeh, N.Bechetoille, O.Berthier, O.Sabido, D.Schmitt, C.Genin, and L.Misery. 2003. *In vitro* reconstructed mucosa-integrating Langerhans' cells. *Experimental Dermatology* 12:346-355.

Sozzani, S., P.Allavena, A.Vecchi, and A.Mantovani. 2000. Chemokines and dendritic cell traffic. *J Clin. Immunol* 20:151-160.

Steinman, R.M., K.Inaba, S.Turley, P.Pierre, and I.Mellman. 1999. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum. Immunol* 60:562-567.

Stoof, T.J., J.Flier, S.Sampat, C.Nieboer, C.P.Tensen, and D.M.Boorsma. 2001. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Br. J Dermatol.* 144:1114-1120.

Sunderkotter, C., T.Nikolic, M.J.Dillon, R.N.Van, M.Stehling, D.A.Drevets, and P.J.Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.

Tanaka, Y., D.H.Adams, S.Hubscher, H.Hirano, U.Siebenlist, and S.Shaw. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361:79-82.

Tang, A., M.Amagai, L.G.Granger, J.R.Stanley, and M.C.Udey. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82-85.

Turville, S.G., P.U.Cameron, A.Handley, G.Lin, S.Pohlmann, R.W.Doms, and A.L.Cunningham. 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol* 3:975-983.

Valladeau, J., O.Ravel, C.zutter-Dambuyant, K.Moore, M.Kleijmeer, Y.Liu, V.Duvert-Frances, C.Vincent, D.Schmitt, J.Davoust, C.Caux, S.Lebecque, and S.Saeland. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* 12:71-81.

van der Aar, A.M., R.M.Sylva-Steenland, J.D.Bos, M.L.Kapsenberg, E.C.de Jong, and M.B.Teunissen. 2007. Cutting edge: Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* 178:1986-1990.

Vanbervliet, B., B.Homey, I.Durand, C.Massacrier, S.it-Yahia, B.O.de, A.Vicari, and C.Caux. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur. J Immunol* 32:231-242.

Vremec, D., G.J.Lieschke, A.R.Dunn, L.Robb, D.Metcalf, and K.Shortman. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J Immunol* 27:40-44.

Weis, M., C.L.Schlichting, E.G.Engleman, and J.P.Cooke. 2002. Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1817-1823.

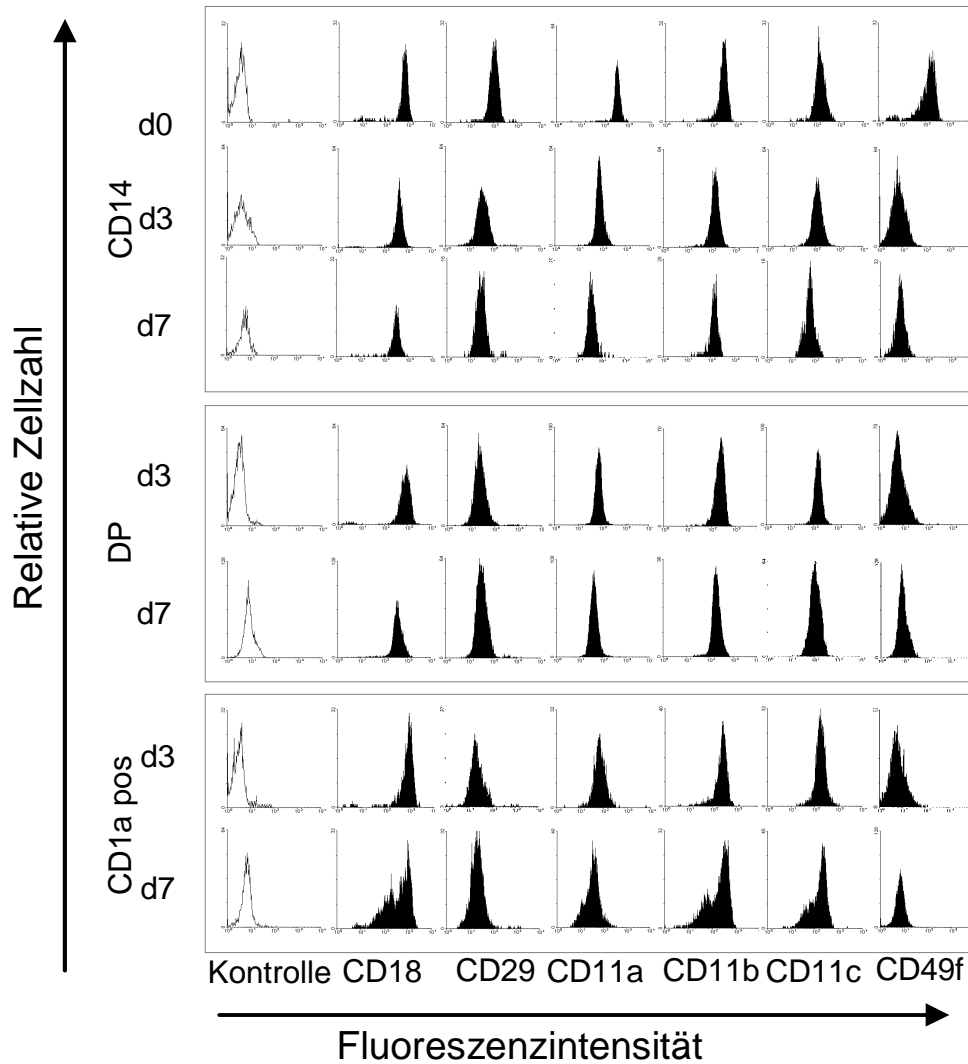
Wolf, K. and P.Friedl. 2006. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br. J Dermatol.* 154 Suppl 1:11-15.

Yoshie, O. 2000. Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells. *Int. J Hematol.* 72:399-407.

Yrlid, U., C.D.Jenkins, and G.G.MacPherson. 2006. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 176:4155-4162.

6 Anhang

Tabelle I: Expression von Integrinen auf MoDC an d3 und d7



MoDC wurden an d3 und d7 mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD1a gefärbt, zusätzlich wurden sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Integrine, die indirekt an FITC gekoppelt wurden, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Subpopulationen der MoDC wurden durch Quadrantenanalyse anhand der Färbung von unspezifischen Antikörpern gleichen Isotyps ermittelt. Aufgetragen ist die Zellzahl gegenüber der Fluoreszenzintensität der FITC-Färbung auf den analysierten MoDC. Als Kontrolle für die FITC-Färbung wurde ein unspezifischer Antikörper eines Isotypen ausgewählt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3.

Tabelle II: Bindung von CD34DC Subpopulationen an Laminin 332 und Fibronectin

Exp	Fibronectin		Laminin 332	
	CD14 _{pos}	CD1a _{pos}	CD14 _{pos}	CD1a _{pos}
1	6.3 ± 1.7	30.3 ± 3.8	70.3 ± 19.8	43.7 ± 13.0
2	2.2 ± 1.9	67.7 ± 7.5	100 ± 0	57.4 ± 27
3	2.1 ± 0.7	47.9 ± 3.6	69.4 ± 10.4	20.7 ± 7.2

CD34DC an d7 wurden nach Adhäsion an Laminin 332 oder Fibronectin mit Methanol fixiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD1a und CD14 immunhistologisch gefärbt. Positiv angefärbte Zellen wurden in fünf verschiedenen Feldern unter dem Mikroskop gezählt. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anzahl positiver Zellen (+/-SD) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle III: Ergebnisse des Chemokin-Array Tests

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	BLC	CCL28	Cκb8-1	CTACK	CXCL16	ENA-78	Eotaxin	Eotaxin-2
2	Eotaxin-3	Fractalkine	GCP-2	GRO	GROα	HCC-4	I-309	I-TAC	IL-8	IP-10	Lymphotactin	MCP-1
3	MCP-2	MCP-3	MCP-4	MDC	MIG	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1δ	MIP-3α	MIP-3β	MPIF-1	NAP 2
4	PARC	RANTES	SDF-1α	SDF-1β	TARC	TECK						POS

FCM	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	169,46	87,97	0,95	1,42	1,91	4,90	1,84	8,13	9,47	3,61	1,69	2,02
2	31,66	26,81	0,23	60,23	4,63	0,69	2,97	0,53	156,08	7,45	7,06	153,04
3	2,17	4,69	0,23	3,97	8,39	7,72	18,35	6,20	2,38	19,15	1,15	19,22
4	4,73	10,04	2,63	3,62	3,67	4,57						161,06

C+D/2	Neg *2
1,18	2,37

EnCM	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	549,85	604,90	5,87	2,62	2,16	11,03	7,21	14,05	22,33	10,29	2,49	3,80
2	45,15	46,73	0,76	149,85	30,45	4,16	10,99	1,02	790,26	4,88	17,03	148,59
3	1,84	6,04	4,39	7,14	7,26	10,52	28,18	3,21	7,80	14,06	3,47	23,84
4	10,71	31,09	3,57	5,64	2,92	2,99						157,71

C+D/2	Neg *2
4,24	8,48

KCM	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	154,62	155,32	1,66	2,01		3,68	5,20	21,90	41,25	4,18	1,24	1,45
2	46,14	38,70		159,85	88,08	2,39	5,04		299,39	4,13	18,33	1,73
3	1,58	3,37	4,21	4,97	5,26	13,29	35,41	14,17	17,41	4,06	0,95	16,16
4	9,79	21,89	4,21	5,48	1,92	7,92						131,26

C+D/2	Neg *2
1,83	3,67

Chemokine in den konditionierten Medien von Endothelzellen (EnCM), Fibroblasten (FCM) und Keratinozyten (KCM)

Mit Hilfe eines Chemokin-Array Tests konnten in den konditionierten Medien von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten 38 Chemokine nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten der densitometrischen Analyse von den belichteten Röntgenfilmen. Die als positiv ermittelten Ergebnisse, die den zweifachen Wert der Negativkontrolle überstiegen, wurden farbig unterlegt.

Tabelle IV: Expression von Chemokinrezeptoren auf Monozyten im Verlauf der sequenziellen Migration

	Input	1.Mig		Input + 18h	2.Mig				
		FCM	CTL		Nicht migriert		FCM		
					KCM	CTL	KCM	CTL	
CCR1	CD14								
Experiment 1	low	-	++	+++	+++	+	+	+	+
	high	+++	++++	++++	++++	+	++	++	+++
Experiment 2	low	-	+	++	++	-	+	+	+
	high	+	++++	++++	++++	+++	+++	++++	++++
Experiment 3	low	-	++	++++	+++	+	-	+	-
	high	+	+++	+++	++	+	++	++	+++
CCR2									
Experiment 1	low	+	++	+	-	-	-	+	-
	high	+++	+++	+	+	-	-	+	+
Experiment 2	low	-	++	+	+	-	-	-	-
	high	+	++++	+++	+	-	-	+	+
Experiment 3	low	-	+	++	++	+	-	+	-
	high	-	+++	++	+	+	+	+	++
CCR3									
Experiment 1	low	-	++	+	+	+	+	+	+
	high	++++	+++	+	++	++	+	++	+++
Experiment 2	low	-	+	+	+	-	+	-	-
	high	+	+++	+	+	+	-	+	+
Experiment 3	low	+	+	+	++	-	-	-	-
	high	++	+++	+	+	-	+	+	++
CX3CR1									
Experiment 1	low	+++	++	-	+	+	+	+	-
	high	+++	+++	+	++	++	++	++	++
Experiment 2	low	-	+	-	+	-	-	-	-
	high	-	++	+	+	-	-	-	-
Experiment 3	low	-	+	+	++	-	-	-	-
	high	-	++	-	+	-	+	-	+

Frisch isolierte Monozyten wurden in die obere Kammer des Transwells gegeben, die Membran wurde zuvor mit Matrigel™ und Endothelzellen beschichtet, in der unteren Kammer war als Chemoattraktans FCM oder CTL. Nach vier Stunden wurden die migrierten Zellen gezählt und für 18h weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden Monozyten nach der Isolierung in Monozyten-Medium ohne Zytokine kultiviert. Vor der zweiten Migration wurde ein Teil der Zellen auf die Expression von CCR1, CCR2, CCR3 und CX₃CR1 immunzytometrisch analysiert. In der zweiten Migration war die Transwell-Membran nur mit Matrigel™ beschichtet und in der unteren Kammer befand sich KCM oder CTL als Chemoattraktans. Nach vier Stunden Migration wurden die Zellen in der unteren Kammer gezählt und die Expression von CCR1, CCR2, CCR3 und CX₃CR1 immunzytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Zusammenfassung der Expression der Rezeptoren auf den CD14_{low} und CD14_{high} Monozyten, wobei + = 5-25%, ++ = 25-50%, +++ = 50-75% und ++++ = 75-100% Expression entsprechen. Gezeigt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle V: Heterodimere der Integrine und ihre Liganden

Integrin	CD-Nummer	Trivialname	Ligand
$\beta 1 \alpha 1$	CD29/ CD49a	VLA-1	Natives Kollagen, Laminin
$\alpha 2$	CD29/ CD49b	VLA-2	Natives Kollagen, Laminin
$\alpha 3$	CD29/ CD49c	VLA-3	Fibronectin, Laminin, Natives Kollagen
$\alpha 4$	CD29/ CD49d	VLA-4	Fibronectin (splicing domain), VCAM-1
$\alpha 5$	CD29/CD49e	VLA-5	Fibronectin (RGD-containing domain)
$\alpha 6$	CD29/ CD49f	VLA-6	Laminin
$\alpha 7$	CD29/		Laminin
$\alpha 8$	CD29/		Fibronectin, Vitronectin
$\alpha 9$	CD29/		Tenascin
$\alpha 10$	CD29/		Laminin
$\alpha 11$	CD29/		Laminin
αv	CD29/CD51		Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin
$\beta 2 \alpha L$	CD18/CD11a	LFA-1	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
αM	CD18/CD11b	Mac-1, CR3	C3b, Fibrinogen, ICAM-1, VCAM-1
αX	CD18/CD11c	CR4, p150.95	C3b
αD	CD18/CD11d		ICAM-3, VCAM-1
$\beta 3 \alpha IIb$	CD61/CD41	GIIb/IIIa	Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor, Vitronectin, Thrombospondin
αv	CD61/CD51	Vitronectin	Vitronectin, denaturiertes Kollagen, von Willebrand Faktor, Fibrinogen, Thrombospondin, Fibulin, Osteopontin
$\beta 4 \alpha 6$	CD104/CD49f	$\beta 4$ -Integrin	Laminin, Desmin
$\beta 5 \alpha v$	/CD51		Vitronectin
$\beta 6 \alpha v$	/CD51		Fibronectin
$\beta 7 \alpha 4$	/CD49d		Fibronectin (splicing domain), VCAM-1, MAdCAM-1
αE	/CD103	HML-1, $\alpha 6$ -, αE -integrin	E-cadherin
$\beta 8 \alpha v$	/CD51		Vitronectin

Tabelle VI: Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine		Rezeptor
Systematischer Name	Funktioneller Name	
CCL1	I-309,TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR1
CCL3	MIP1 α	CCR2
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR5
CCL6	MRP-1	
CCL7	MCP-3	CCR10
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2B
CCL12	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL15	MIP-5	CCR1, CCR3
CCL19	MIP3 β	CCR7
CCL20	MIP3 α	CCR6
CCL21	6Ckine, Exodus-2	CCR7
CCL26	Eotaxin-3	CCR3
CCL27	CTACK	CCR10
CXCL1	GRO α	CXCR2
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL7	NAP	CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL12	SDF-1	CXCR4
CXCL16		CXCR6
XCL1	Lymphotactin	XCR1
CX ₃ CR1	Fractalkine	CX ₃ CL1

Tabelle VII: Eingesetzte Antikörper

Antikörper	Methoden	Gekoppelt	Isotyp	Klon	Firma
CCR1	DF	nein	IgG2b (Maus)	53504	R&D System, Wiesbaden
CCR2	DF	nein	IgG2b (Maus)	48607	R&D System, Wiesbaden
CCR3	DF	nein	IgG2a (Ratte)	61828	R&D System, Wiesbaden
CCR6	DF	nein	IgG1 (Maus)	11A9	BD Bioscience, Heidelberg
CD11a	DF	nein	IgG1 (Maus)	HI111	BD Bioscience, Heidelberg
CD11b	DF	nein	IgG1 (Maus)	ICRF44	BD Bioscience, Heidelberg
CD11c	DF	nein	IgG1 (Maus)	B-ly6	BD Bioscience, Heidelberg
CD14	DF	APC	IgG2a (Maus)	MΦP9	Beckman Coulter, Krefeld
CD14	IHC	nein	IgG1 (Maus)	B-A8	Biovendor, Heidelberg
CD16	DF	nein	IgG1 (Maus)	3G8	Beckman Coulter, Krefeld
CD18	DF	nein	IgG1 (Maus)	L130	BD Bioscience, Heidelberg
CD1a	DF	PE	IgG1 (Maus)	T6	Beckman Coulter, Krefeld
CD1a	IHC	nein	IgG1 (Maus)	BL 6	Beckman Coulter, Krefeld
CD29	DF	nein	IgG1 (Maus)	MAR4	BD Bioscience, Heidelberg
CD31	DF	nein	IgG1 (Maus)	WM-59	BD Bioscience, Heidelberg
CD31	IHC	nein	IgG1 (Maus)	JC/70A	Dianova, Hamburg
CD34	DF	PE	IgG1 (Maus)	581	BD Bioscience, Heidelberg
CD49b	DF	nein	IgG2a (Maus)	12F1-H6	BD Bioscience, Heidelberg

Antikörper	Methoden	Gekoppelt	Isotyp	Klon	Firma
CD49c	DF	nein	IgG1 (Maus)	C3 II.1	BD Bioscience, Heidelberg
CD49e	DF	nein	IgG1 (Maus)	IIA1	BD Bioscience, Heidelberg
CD49f	DF	nein	IgG2a (Ratte)	GoH3	BD Bioscience, Heidelberg
CX3CR1	DF	nein	IgG2b (Ratte)	2A9-1	MBL, Nagoya, Japan
E-Cadherin	DF	nein	IgG1 (Maus)	67A4	Beckman Coulter, Krefeld
Langerin	DF	nein/PE	IgG1 (Maus)	DCGM4	Beckman Coulter, Krefeld
Maus-IgG1	DF	PE	IgG1 (Maus)	MOPC-21	BD Bioscience, Heidelberg
Maus-IgG1	DF, IHC	nein	IgG1 (Maus)	MOPC-21	Sigma, Taufkirchen
Maus-IgG2a	DF	APC	IgG2a (Maus)	X39	Becton Dickinson
Maus-IgG2a	DF	nein	IgG2a (Maus)	G155	BD Bioscience, Heidelberg
Maus-IgG2b	DF	nein	IgG2b (Maus)	MOPC-141	Sigma, Taufkirchen
MCP-1	Neutralisierung	nein	Kaninchen	Polyklonal	PeptoTech Inc., NJ, USA
MIP-3a	Neutralisierung	nein	Kaninchen	Polyklonal	PeptoTech Inc., NJ, USA
FITC-Ziege-anti-Maus-IgG (F(ab)2-Fragment)					Dianova, Hamburg

Tabelle VIII: Eingesetzte Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Fragment-Länge (bp)	TM	Zyklen
CD49b	gtgcctttggacaagtgggt	tgagcagctggatttgcg	514	57	38
CD49c	tctctccttgccacagact	tggcttgcagggtctctct	232	55	40
CD49d	ggggaaaatctcagcaatga	aacacagcccgtaggaaatg	406	55	34
CD49e	cccagactctttggctctg	gcaagatctgagccttgcc	572	55	38
CD49f	ggcgggtttatgtctgagt	catgctcagtctctccacca	282	55	38
β-Aktin	gagcgggaaatcgtgcgtgagatt	gatggagttgaaggtagtttcgtg	240	55	30
CCR1	ctcttctgttcacgcttcc	gcctgaaacagcttccactc	355	55	36
CCR2	tggtgtgtttgcttctgctc	tctcactgcctatgcctct	229	55	38
CCR3	gacctgcttctctcgtcac	atgctggtgatgacacaaaa	227	55	38
CCR6	gaggtcaggcagttctccag	gctgccttgggtgtgtatt	465	55	38
CX3CR1	actcgtctctggtaaagtctg	ggctttggcttcttctgtgg	773	55	36

6.2 Publikationen

Kohl K, Klein E, Koch S, Schnautz S, Bieber T: Migration and differentiation of Langerhans cell precursors. *Eur. J. Cell Biol.* 83 (2004) 805-11

Koch S, Kohl K, Klein E, von Bubnoff D, Bieber T: Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan; 117(1):163-8

Kohl K, Schnautz S, Pesch M, Klein E, Aumailley M, Bieber T, Koch S : Subpopulations of human dendritic cells display a distinct phenotype and bind differentially to proteins of the extracellular matrix. Manuskript.

6.2.1 Posterbeiträge und Vorträge

Posterbeiträge

A model of in vitro reconstituted skin: Migration of dendritic cells. K. Kohl, E. Klein, S. Koch, S. Schnautz, J. Weißendorf, T. Bieber Treffen der DFG-Forschergruppe „Keratinocyten-Proliferation und differenzierte Leistung in der Epidermis“ 2004

Migration and differentiation of Langerhans cell precursors. K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, T. Bieber, S. Koch Jahrestagung der DGFI 2005

Subpopulations of human dendritic cells display a distinct phenotype and bind differentially to proteins of the extracellular matrix. K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, M. Pesch, A. Dolf, T. Bieber M. Aumailley and S. Koch Treffen der DFG-Forschergruppe „Keratinocyten-Proliferation und differenzierte Leistung in der Epidermis“ 2006

Chemotactic response of human dendritic cell subpopulations towards signals from skin-derived endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, T. Bieber, S. Koch Treffen der DFG-Forschergruppe „Keratinocyten-Proliferation und differenzierte Leistung in der Epidermis“ 2006

Differentiation signals for human Langerhans cells precursors identified by sequential migration of monocytes K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, T. Bieber, S. Koch ADF 2007

Vorträge

Adhesion and chemotaxis of Langerhans cell precursors. K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, T. Bieber, S. Koch 5. Workshop „Tumorstabilisierung mit Dendritischen Zellen“ Freiburg 2005

Langerhans cells precursors migrate towards chemoattractants produced by endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes K. Kohl, E. Klein, S. Schnautz, T. Bieber, S. Koch Jahrestagung der DGFI 2006

6.3 Danke!

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Bieber für die Leitung der Arbeit und die großzügige Bereitstellung finanzieller Mittel. Weiterhin möchte ich mich für die vielen Laborbesprechungen bedanken, in denen die Diskussionen mich immer wieder auf neue gute Ideen gebracht haben und ich viel gelernt habe.

Bei Herrn Prof. Koch bedanke ich mich für die Leitung der Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät und die Vorschläge, die er mir übermitteln ließ.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Susanne Koch. Ohne die exzellente Betreuung und die ständige Bereitschaft mit mir jedes noch so kleine Detail zu diskutieren, wären die letzten drei Jahre nicht so lehrreich gewesen, wie sie es ohne Zweifel waren. Danke vor allem auch für das bereitwillige Füttern der Zellen und Häute an den zahlreichen Wochenenden an denen ich es nicht selber übernehmen konnte. Für die gründliche Durcharbeit dieses Manuskriptes und dem damit verbundenen Zeitaufwand möchte ich mich ganz ausdrücklich bedanken.

Sylvia Schnautz möchte ich für die großartige Zusammenarbeit und besonders die vielen unzähligen Tipps für die Laborarbeit und die Organisation der Experimente bedanken. Ohne ihre Hilfe wären viele Ergebnisse nicht zustande gekommen. Danke besonders auch für die schöne Zeit neben der Laborarbeit in den Mittagspausen und in unserem kleinen Kabuff.

Ich werde immer an Dich denken, wenn ich meine Protokolle bunt und strukturiert gestalten werde!

Bei Dr. Jörg Weßendorf bedanke ich mich für die Hilfe bei den molekularbiologischen Methoden und ganz besonders auch für das Korrekturlesen des Manuskriptes. Dank seines Xtremes und den vielen lustigen Geschichten waren die Mittagspausen gut gewürzt. Er brachte sogar zu guter Letzt die Sanierung der Toiletten zu einem guten Ende!

Bei Ela und Julia möchte ich mich für die Freundschaft und das gemeinsame Durchhalten während der Arbeit bedanken, wobei auch die Kaffeesitzungen im Cafe Tiero ihren Teil dazu beigetragen haben.

Neben den beiden war auch Steffi ein wichtiges Mitglied unserer kleinen, aber feinen Laborlaufgruppe. Mit ihr zusammen hat sogar das Diäten auch in kuchenreichen Zeiten Spaß gemacht!

Bei allen anderen Mitgliedern der Immunbiologie und der Experimentellen Dermatologie sowie der Histologie möchte ich mich für die gelungenen Feiern und die Zusammenarbeit bedanken.

Den Hebammen des Johanniterhospitals in Bonn danke ich für ihre gute Zusammenarbeit.

Den vielen freiwilligen Blutspendern möchte ich ebenfalls danken, ohne deren Blut ich diese Experimente nicht hätte durchführen können.

Bei Frau Prof. Aumailley und Monika Pesch bedanke ich mich für die produktive Zeit und die gute Zusammenarbeit in deren Laboren in Köln.

Allen Freunden außerhalb von Bonn, die immer für mich da waren und sind, möchte ich für ihre Unterstützung danken. Besonders möchte ich „meiner“ Julia danken, die eine feste Größe in meinem Leben darstellt!

Meiner Mutter danke ich für ihre immerwährende Unterstützung, die mich durch manche schwierigere Zeit begleitet hat. Ihr ungebrochener Glaube an mich und meine Fähigkeiten gibt mir Mut und Hoffnung für die vielen Aufgaben, die mir gestellt wurden und werden. Ebenso wusste ich, dass ich mich immer bei meinem Bruder über die allgemeinen Ungerechtigkeiten ausweinen konnte, danke auch dafür!

Meinem Freund Christian danke ich für seine große Geduld und sein Verständnis, das er nicht nur in der letzten Phase dieser Arbeit für mich hatte. Nicht nur für mich hatte er Verständnis sondern auch für meine Zellen, er akzeptierte, dass die Wochenenden in Bonn meistens mit Zellfütterung verbunden waren. Ohne seine Durchhalteparolen wäre vieles mühsamer gewesen!