

Etablierung eines *in vivo* Modells
zur Untersuchung der Rolle
epidermaler Langerhanszellen bei der Entstehung
der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
nach allogener Blutstammzelltransplantation

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Julia Anne Hemmerling
geb. am 02.02.1982 in Mainz

Mainz, 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2011

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht im Journal of Immunology
Published online before print June 22, 2011, doi: 10.4049/jimmunol.100149
<http://www.jimmunol.org/content/187/3/1142.abstract>

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben zu haben.

Ort, Datum

Julia Hemmerling

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS IMMUNSYSTEM – EINE EINFÜHRUNG	1
1.1.1. <i>Natürliche und adaptive Immunität</i>	2
1.1.2. <i>HLA-Moleküle, Peptidprozessierung und -präsentation</i>	3
1.1.3. <i>Genetische Organisation</i>	4
1.1.4. <i>T-Lymphozyten</i>	5
1.2. ORGANISATION DER HAUT	6
1.3. IMMUNZELLEN DER HAUT	8
1.3.1. <i>Antigenpräsentierende Zellen - APC</i>	8
1.3.2. <i>Langerhanszellen - LC</i>	11
1.3.3. <i>Dermale dendritische Zellen - DDC</i>	13
1.4. HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION	14
1.5. GRAFT VERSUS HOST DISEASE - GvHD	15
1.5.1. <i>Pathomechanismus der GvHD</i>	16
1.5.2. <i>APC und GvHD</i>	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. MATERIAL	18
2.1.1. <i>Geräte</i>	18
2.1.2. <i>Verbrauchsmaterial</i>	20
2.1.3. <i>Glaswaren</i>	22
2.1.4. <i>Operationsbesteck</i>	22
2.1.5. <i>Chemikalien</i>	23
2.1.6. <i>Medikamente, Medien und Zusätze</i>	24
2.1.7. <i>Zytokine</i>	25
2.1.8. <i>Zellkulturmedien</i>	26
2.1.9. <i>Puffer und Lösungen</i>	26
2.1.10. <i>Antikörper</i>	29
2.1.11. <i>ELISpot</i>	31
2.1.12. <i>Kits</i>	32
2.1.13. <i>Zelllinien und Blutlymphozyten</i>	33
2.1.14. <i>Versuchstiere</i>	33
2.1.15. <i>Mausstamm</i>	34
2.2. METHODEN	35
2.2.1. <i>Zellkultur</i>	35
2.2.2. <i>Isolation von peripheren mononukleären Blutlymphozyten</i>	35
2.2.3. <i>Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten</i>	36
2.2.4. <i>Isolation von CD8 positiven T-Zellen</i>	36
2.2.5. <i>Stimulation von Lymphozyten in der Kultur mit dendritischen Zellen</i>	37
2.2.6. <i>Interferon-γ-ELISpot-Assay</i>	38
2.2.7. <i>Kryokonservierung von Zellen</i>	40
2.2.8. <i>PCR – Polymerase Kettenreaktion</i>	40
2.2.9. <i>Immunhistochemie - IHC</i>	41
2.2.10. <i>Prinzip des Dako Real™ EnVision™ / HRP, Detektionssystems</i>	43
2.2.11. <i>Prinzip des Dako REAL™ Alkaline Phosphatase / RED, Detektionssystems</i>	44
2.2.12. <i>Die immunhistochemische Färbung</i>	44
2.2.13. <i>Hautgewinnung</i>	46
2.2.14. <i>Transplantation</i>	46
2.2.15. <i>Biopsieentnahme</i>	48
2.2.16. <i>Organentnahme</i>	48
2.2.17. <i>Epidermis Präparation</i>	48

3. ERGEBNISSE	51
3.1. HAUTTRANSPLANTATION	53
3.1.1. <i>Hautqualität</i>	53
3.2. METHODEN DER TRANSPLANTATION	54
3.2.1. <i>Histologie der Transplantierten Haut</i>	55
3.3. ZELLPOPULATIONEN IM VERLAUF DES HEILUNGSPROZESSES	56
3.3.1. <i>MZAZ1</i>	57
3.4. LANGERHANSZELLDEPLETION MITTELS UVC STRAHLUNG	61
3.4.1. <i>F410, F510, G410</i>	61
3.5. AUSLÖSEN EINER ALLOGENEN T-ZELLANTWORT	66
3.5.1. <i>S109 und S209</i>	67
3.6. ROLLE DER LC	71
3.6.1. <i>S108</i>	71
3.7. LC DEFIZIENTE TRANSPLANTATE	77
3.7.1. <i>S208</i>	77
4. DISKUSSION.....	81
4.1. XENOTRANSPLANTATE ALS MODELL FÜR HUMANE HAUTERKRANKUNGEN	81
4.2. LC IM XENOTRANSPLANTATIONSMODELL	88
4.3. LC ALS ZIELZELLEN DER GVHD	93
5. ZUSAMMENFASSUNG	96
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	98
7. ANHANG.....	107
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107

1. EINLEITUNG

1.1. DAS IMMUNSYSTEM – EINE EINFÜHRUNG

Das Immunsystem dient dem menschlichen Organismus als Schutz vor Infektionen durch Pathogene wie z. B. Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten). Es hat auch die Fähigkeit, Tumorzellen zu erkennen, wenn diese durch Veränderung ihrer genetischen Eigenschaften Antigene ausbilden, welche von Immunzellen als „fremd“ erkannt werden. Eine Immunreaktion erfolgt auch nach Transplantation von fremdem Spendergewebe.

Der Schutz, den das Immunsystem bietet, ist ein komplexes Wechselspiel verschiedener Akteure. Zu den ersten Schutzbarrieren des Immunsystems, die ein Infektionserreger überwinden muss, gehören physikalische und biochemische Mechanismen. Zu den physikalischen Barrieren zählen u.a. die Haut und Schleimhäute. Biochemisch sind Enzyme beteiligt, wie z.B. das Lysozym im Tränenfilm. Die zweite Reihe von Abwehrmechanismen wird gebildet von der angeborenen (natürlichen) und der erworbenen (adaptiven) Immunität [1].

1.1.1. Natürliche und adaptive Immunität

Überwindet eine körperfremde Substanz die physikalische Schutzbarriere des Körpers und dringt in den Organismus ein, so wird als Reaktion darauf eine Immunantwort eingeleitet. Diese besteht aus dem Zusammenspiel der natürlichen und der adaptiven Immunantwort. Die natürliche Immunantwort setzt sich aus einer zellulären und einer humoralen Komponente zusammen. Die zelluläre Komponente bilden Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten), natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Helferzellen. An der humoralen Komponente sind das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokine beteiligt. Die Mechanismen des natürlichen Immunsystems erkennen konservierte Molekülstrukturen und Muster. Sie sind nicht in der Lage zu „lernen“ und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden [2, 3]. Phagozyten nehmen eingedrungene Substanzen durch Phagozytose auf, prozessieren und zerstören diese. Zur Erkennung von pathogen-assoziierten Strukturen besitzen sie unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLR), spezielle Oberflächenmoleküle, welche zur Gruppe der PRR (Pattern Recognition Rezeptoren) gehören. Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen werden darüber erkannt, und eine Aktivierung des antigenspezifischen, erworbenen Immunsystems eingeleitet und moduliert [4, 5].

Die adaptive Immunantwort besteht ebenfalls aus einer zellulären und einer humoralen Komponente. Für die zelluläre Immunantwort sind hauptsächlich die T-Lymphozyten verantwortlich. Diese haben die Fähigkeit, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren. Nach Antigenkontakt liegen die antigenspezifischen Lymphozyten bereits im Blut vor und eine klonale Selektion durch Proliferation kann schnell eingeleitet werden. Bei wiederholter Infektion wird so eine schnellere und verstärkte antigenabhängige Immunantwort ausgelöst [2, 3]. Für die Spezifität dieser Abwehr, wird der Prozess der Antigenpräsentation benötigt. An diesem Prozess sind antigenpräsentierende Zellen (APC, engl. *antigen presenting cell*) und bestimmte Lymphozyten beteiligt.

Dendritische Zellen (DC) vermitteln somit zwischen dem adaptiven und dem zellulären Immunsystem. Die antigenpräsentierende Zelle stellt eine wichtige Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität dar. Sie phagozytieren Antigene und migrieren in die sekundären lymphatischen Organe (SLO, engl. *secondary lymphoid organ*). Dort präsentieren sie das Antigen den T-Lymphozyten. Abhängig vom Aktivierungszustand der DC führt diese Erkennung zu einer

Immunantwort oder zu Toleranz. Die Fähigkeit naive (Antigen-unerfahrene) T-Zellen zu aktivieren ist eine weitere Eigenschaft der DC. Sie wird als „*priming*“ bezeichnet. An diesem Prozess sind kostimulatorische Moleküle der professionellen APC, der TCR (engl., *T cell receptor*) und der MHC-Antigen-Komplex (MHC, engl. *Major histocompatibility complex*) beteiligt.

Die Kombination dieser Signale aktiviert die T Zelle und führt zu Interleukin-2 Produktion, klonaler Expansion und weiteren Effektorfunktionen. T-Lymphozyten werden durch den Kontakt mit DC in den SLO aktiviert und differenzieren sich. Sie wandern von den SLO zum Entzündungsherd und attackieren dort das betroffene Gewebe.

Die humorale Komponente der adaptiven Immunantwort richtet sich gegen extrazelluläre Erreger und Toxine und wird durch lösliche Antikörper, welche von ausdifferenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) produziert werden, vermittelt.

Erst durch die komplexe Interaktion aller Teile des Immunsystems ergeben sich so effiziente Strategien zur Bekämpfung von Pathogenen.

1.1.2. HLA-Moleküle, Peptidprozessierung und -präsentation

Der MHC stellt einen genetischen Locus dar, dessen Proteine für die Antigenpräsentation entscheidend sind und der seinen Namen aufgrund seiner Rolle bei der Gewebeverträglichkeit von Transplantaten erhalten hat [6]. Der humane MHC wird auch HLA (HLA, engl. *human leukocyte antigen*) genannt. MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche sind in der Lage, Antigen zu präsentieren, welches von T-Lymphozyten erkannt wird [7].

Beim Menschen ist das HLA Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 zu finden und wurde zunächst als Alloantigen auf Leukozyten beschrieben [8, 9]. Es gibt zwei Arten von klassischen HLA-Molekülen, welche sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wohingegen HLA-Klasse-II-Moleküle in der Regel nur auf spezialisierten APC wie B-Lymphozyten, Makrophagen und DC zu finden sind.

HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, die sich in vier Domänen unterteilen. HLA-Klasse-I gebundene Antigene können von CD8 positiven CTL (engl.: *cytotoxic lymphocyte*) erkannt werden [10].

Im Unterschied dazu setzen sich HLA-Klasse-II-Moleküle aus zwei nicht kovalent assoziierten schweren Polypeptidketten zusammen, welche beide, neben jeweils

zwei extrazellulären Domänen, ebenfalls eine Transmembranregion und einen zytoplasmatischen Teil besitzen. Sie unterscheidet sich von der Klasse-I-Grube außerdem dadurch, dass sie an beiden Enden offen, und damit zugänglich für größere Peptidfragmente ist [11]. HLA-Klasse-II gebundene Peptide können nur von CD4 positiven Lymphozyten (T-Helferzellen) erkannt werden.

1.1.3. Genetische Organisation

Die schweren Ketten der klassischen HLA-Moleküle (α -Kette bei Klasse-I bzw. α - und β - Kette bei Klasse-II) werden beim Menschen von mehreren auf Chromosom 6 liegenden Gen-Loci kodiert (Polygenie).

Im Falle von HLA-Klasse-I sind dies drei (HLA-A, -B und -C), bei HLA-Klasse-II sind es sogar fünf Loci (HLA-DP, -DQ, -DR, -DM und -DO). Weiterhin liegen von jedem Locus ein väterlicher und ein mütterlicher Haplotyp vor (Diploidie). Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des kodierenden HLA-Genclusters ist ein außergewöhnlich starker Polymorphismus. Es sind mehr als hundert Allele pro HLA-Locus bekannt. Damit ist dies der menschliche Gencluster, mit dem stärksten Polymorphismus, der bisher identifiziert wurde [11].

Die Kombination von Diploidie, Polygenie und Polymorphismus trägt zu einer sehr großen genetischen Varietät bei, welche das Auffinden von zwei Individuen mit komplett identischem HLA-Profil mitunter sehr erschwert. Aufgrund der Diploidie, des starken Polymorphismus und der kodominanten Expression der Gene der schweren Ketten besitzen die meisten Menschen bis zu sechs verschiedene HLA-A-, -B- und -C-Moleküle. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass, auf Populationsebene betrachtet, eine überlebenssichernde Immunantwort ausgelöst werden kann, da ein ausreichender Teil der Bevölkerung die entsprechenden HLA-Moleküle besitzt, um Peptide eines beliebigen Pathogens präsentieren zu können.

Neben den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen HLA-A, -B und -C (Klasse-Ia) gibt es noch weitere Gene und Pseudogene, die für nicht-klassische HLA-Moleküle (Klasse-Ib) kodieren [12, 13] und nur wenig polymorph sind. Auf diese wird nicht weiter eingegangen.

1.1.4. T-Lymphozyten

Alle T Lymphozyten sind immunphänotypisch durch den Marker CD3 (engl.: *cluster of differentiation 3*) gekennzeichnet. Zusammen mit dem TCR formt CD3 einen Komplex, welcher der Antigenerkennung dient. Im Menschen gibt es zwei Formen des TCR: den $\alpha\beta$ - und den $\gamma\delta$ -TCR, wobei der $\alpha\beta$ -TCR am häufigsten bei T-Lymphozyten vorkommt [14].

Es gibt zwei Subtypen des T-Lymphozyten, welche sich in ihrer Spezifität zu HLA-Klasse-I-Molekülen oder HLA-Klasse-II-Molekülen unterscheiden. Einer dieser Subtypen wird CD8 (auch CTL oder T-Killerzelle), der andere CD4 (oder T-Helferzelle) genannt. CD4 positive Zellen erkennen ihr Antigen über HLA-Klasse-II-Moleküle und sind vor allem in immunmodulatorische Prozesse eingebunden. T-Zellen können weiter unterteilt werden, anhand von spezifisch produzierten Zytokinen [15]. CD8 Zellen erkennen Peptide, welche über HLA-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Sie sind spezialisiert darauf, Zellen abzutöten, welche Bakterien enthalten, virusinfiziert sind, oder in irgendeiner Form degeneriert sind [16]. Alle T-Zellen benötigen verschiedene Signale, um zu proliferieren und Ihre Effektorfunktion wahrzunehmen. Eine besondere Gruppe der CD3 positiven T-Lymphozyten bilden die Zellen mit dem $\gamma\delta$ -TCR. Diese sind, verglichen mit den $\alpha\beta$ -TCR T-Zellen, im Lymphknoten im Verhältnis von 1:50 enthalten. In der Epidermis jedoch liegt ein Verhältnis von 1:5 vor [17]. Diese spezielle Gruppe erkennt ihr Antigen nicht über MHC-Moleküle, sondern über virale Glycoproteine, welche über CD1 präsentiert werden und übernehmen somit eine besondere Rolle in der Hautimmunität [18]. Zudem sind sie in der Lage, Wachstumsfaktoren des Bindegewebes, der Fibroblasten und Keratinozyten zu produzieren. Somit spielen sie auch eine entscheidende Rolle im Prozess der Wundheilung [19].

1.2. ORGANISATION DER HAUT

Die Haut (Cutis, Integument) ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie bedeckt eine Fläche von ca. 2.2 m² beim Erwachsenen und macht ca. 16 % des Körpergewichts aus. Die Haut besteht aus verschiedenen Schichten. Die äußere Schicht, die Epidermis (griech.: *epi* über, darauf; *derma* Haut) variiert im Durchmesser zwischen 75-100 µm in der Dicke [20].

Die Epidermis selbst differenziert sich in mehrere Zellschichten, wobei die oberste Schicht *stratum corneum* oder Hornschicht genannt wird (Abb.1). Diese besteht aus verhornten Keratinozyten und bildet zusammen mit Fetten eine wasserabweisende Schutzschicht. Diese oberste Schicht wird gefolgt vom *stratum granulosum*, welches aus granulären, keratinhaltigen Keratinozyten besteht und ein bis zwei Zellschichten dick ist. Es folgen die Stachelzellschicht, *stratum spinosum*, und die Basalschicht, das *stratum basalis*. Im *stratum spinosum* beginnt der Prozess der Keratinisierung und man findet dort auch die Langerhanszellen (LC). Im *stratum basalis* findet die Zellteilung statt. Die Abgrenzung zur Dermis bzw. Lederhaut, wird durch eine Basalmembran gebildet

Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten, die von Desmosomen zusammengehalten werden. Außerdem finden sich noch Melanozyten, Merkelzellen und LC.

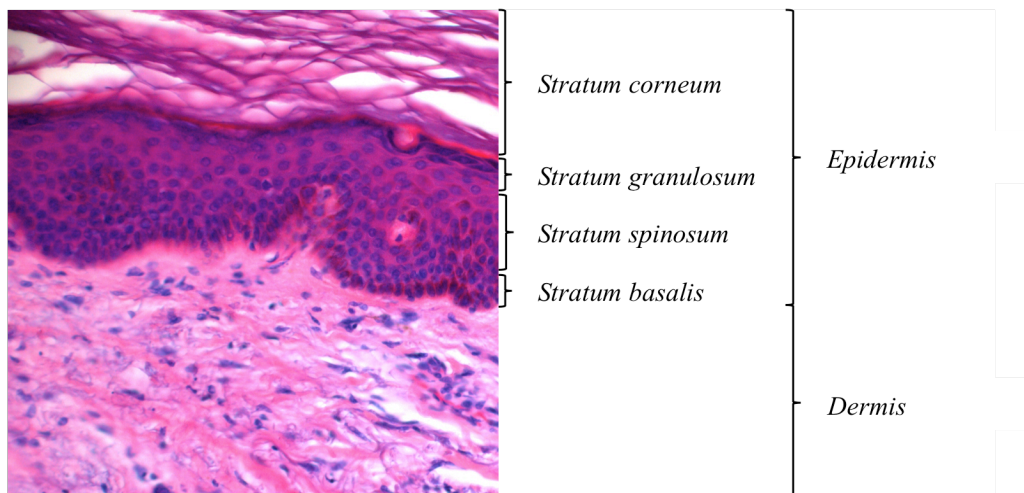


Abbildung 1) Übersicht zur Unterteilung der Haut (H&E Färbung). Grob wird die Haut in Epidermis und Dermis aufgeteilt. Die Epidermis selbst lässt sich in *Stratum corneum*, *S. granulosum*, *S. spinosum* und *S. basalis* unterteilen. Vergrößerung 400x

Die Dermis besteht aus der extrazellulären Matrix (Kollagen, elastische Fasern, Mikrofibrillen, Hyaluronsäure, Dermatansulfat, Fibronectin) und beinhaltet Fibroblasten, DC, Makrophagen, Mastzellen, infiltrierende Lymphozyten, Nerven und Gefäße. Sie dient dem Schutz vor Verletzungen und der Wasserspeicherung. Zudem gibt sie der Haut Festigkeit und Elastizität [21]. Der Durchmesser der dermalen Schicht ist schwer messbar. Eine Grenze zur darunterliegenden Hypodermis fehlt.

Die Dermis selbst unterscheidet zwei Schichten von basal nach apikal: Das *stratum papillare* und das *stratum reticulare*. Das *stratum papillare* besteht aus locker verbundenen Bindegewebspapillen, welche eine große Menge an Blutkapillaren beinhalten und die Epidermis ernähren. Das *stratum reticulare* besteht aus dichtem unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe und Kollagenbündeln.

Die Haut erfüllt viele verschiedene Funktionen, wie z.B. den mechanischen Schutz gegen externe Abrasion oder Verletzung, Thermoregulation und sensorische Wahrnehmung. Zusätzlich ist sie beteiligt an der Wahrung der Homöostase und schützt vor Umwelteinflüssen (wie z.B. ultraviolettem Licht).

Als erste Barriere gegen die Umwelt besitzt die Haut Mechanismen, welche sie vor Gefahren schützen. Die Haut, als eines der größten immunogenen Organe reagiert auf Pathogene und löst Entzündungen und potente T-Zell Antworten aus [22]. Bekannt ist die Haut auch als „immunes System“ [23]. Eine entsprechende Menge an Zellen des Immunsystems sind sowohl in Epidermis wie Dermis enthalten. Hautständige DC nehmen bei einem entzündlichen Prozess fremde Organismen oder deren Bruchstücke über Phagozytose auf, reifen und wandern zu den SLO. Dort präsentieren sie den T-Lymphozyten diese Antigene und bewirken eine Proliferation der reaktiven T-Zellen. Diese wandern dann aus zu dem Herd der Entzündung. Diese immunkompetenten Zellen hämatopoetischen Ursprungs spielen eine systematische Rolle in der immunologischen Kontrolle von Gewebe.

1.3. IMMUNZELLEN DER HAUT

1.3.1. Antigenpräsentierende Zellen - APC

Das Einleiten einer spezifischen Immunantwort wird ermöglicht von APC, da sie eingedrungene Erreger oder veränderte Körperzellen erkennen und deren wirkungsvolle Beseitigung einleiten. Obwohl fast alle Körperzellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation haben, sind mit der Bezeichnung APC die so genannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems gemeint. Zu den Immunzellen der Haut gehören u.a. DC, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten [24]. Diese sind in der Haut als dichtes Netzwerk zu finden [25]. Die Antigenpräsentation stellt bei diesen Zelltypen eine wesentliche Funktion dar und DC sind die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe.

Unreife DC verhalten sich als „*Sentinels*“, sogenannte Wächter, mit einer starken Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. In diesem Stadium können sie jedoch T-Zellen nur gering stimulieren. Ein DC typisches Repertoire an endozytotischen Rezeptoren, wie z.B. Langerin/CD207, Rezeptoren zur Phagozytose, wie z.B. Dectin-2 oder Mannoserezeptoren ermöglichen die Aufnahme von mikrobiellen Produkten und die anschließende Verarbeitung in antigenprozessierenden Zellabteilungen [26, 27]. Der Vorgang der Prozessierung macht diese Zellen zu professionellen APC.

Sie exprimieren konstitutiv das MHC-Klasse-II-Molekül und sind in der Lage exogene phagozytierte Antigene auch über HLA-Klasse-I den CD8 positiven T-Zellen zu präsentieren (Cross-Präsentation). Dies spielt auch nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT, engl. *hematopoietic stem cell transplantation*) eine Rolle. Ein Antigen des Empfängers kann klassisch über HLA-Klasse-I den Spender CTL präsentiert werden und DC des Spenders können über den Weg der Cross-Präsentation Antigene des Empfängers präsentieren [28].

Antigene werden über Endo-, Phago- oder Pinocytose aufgenommen und über MHC-Klasse I oder II Moleküle an der Oberfläche präsentiert. Das Aufnehmen und Erkennen von entzündlichen Produkten aktiviert den Reifungsprozess der DC [29, 30]. Durch diese zusätzlichen Stimuli (bakterielle Substanzen oder freigesetzte Botenstoffe) reifen DC und migrieren zu den SLO, wo sie T-Zellen stimulieren können [31, 32]. Die Reifung der DC ist verbunden mit einer Veränderung ihrer Morphologie, dem Wechsel von Antigenprozessierung und Präsentation und der

vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 und CD86. Diese Reifung macht es erst möglich T-Zellantworten zu generieren [33, 34]. Auch haben diese reifen DC die einzigartige Fähigkeit, T-Zellen aus dem *naïven* Kompartiment zu *primen* [30].

Die lymphatischen T-Lymphozyten, erkennen das von den DC präsentierte Antigen über den TCR und werden so zur klonalen Proliferation angeregt.

Die Reifung und Migration von DC aus ihrem Gewebe in die afferenten Lymphbahnen und ihr *homing* zu den SLO, ist chemokinabhängig. Chemokine sind kleine Proteine, welche eine große Rolle in Immun-, Entzündungs- und viralen Reaktionen spielen [35-37]. Sie binden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die entsprechende Reaktion der Zelle wird durch die Expression dieser Rezeptoren reguliert. Der Rezeptor CCR7 (engl.: *chemokine receptor type 7*) ist z.B. verantwortlich für die Migration von DC zu den SLO [38]. Unreife DC (engl.: *immature dendritic cell*, iDC) sitzen im Gewebe und exprimieren u.a. PSGL-1 (engl.: *P-selectin glycoprotein ligand-1*) und CXCR-1 (engl.: *CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1*). Durch Aktivierung (z.B. LPS, TNF α , Interleukin-1) reifen sie zu reifen DC (engl.: *mature dendritic cell*), exprimieren CCR7. Liganden dieses Rezeptors sind CCL19 (engl.: *chemokine ligand 19*) (ausgeschüttet von Stromazellen und reifen DC in T-Zellarealen) und CCL21 (exprimiert von lymphatischem Endothel). Die Expression von CCR7 wird während des Reifungsprozesses der DC erhöht und steuert das Auswandern zu den lymphatischen Gefäßen und den SLO, wo es ihnen möglich ist T-Zellen zu stimulieren (Abb.2) [39, 40].

Bei der Entwicklung einer Immunantwort stellt die Reifung einen wichtigen Kontrollmechanismus dar [41], da unreife DC nicht nur schlechte Stimulatoren für T-Zellen sind, sondern ihre Aufgabe auch darin besteht, Toleranz zu induzieren [42-44]. Der Reifungsprozess selbst ist irreversibel und endet mit Einleitung der Apoptose [45].

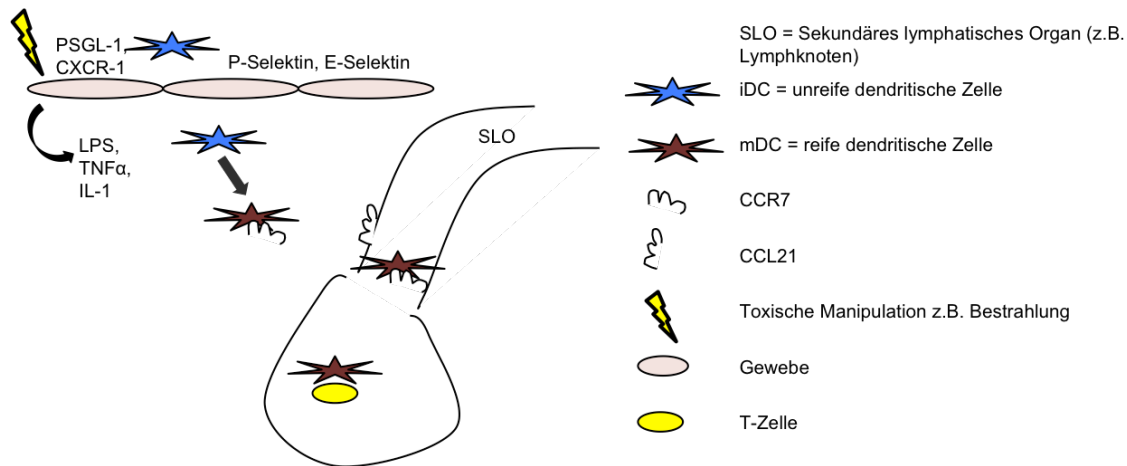


Abbildung 2) Prozess der Auswanderung von DC zu den SLO. Unreife DC (iDC) sitzen im Gewebe und exprimieren u.a. PSGL-1 und CXCR-1. Durch Aktivierung (z.B. durch Aufnahme von freigesetztem LPS, TNF α oder IL-1) reifen sie zu mDC, exprimieren den Rezeptor CCR7 und können so in die SLO migrieren, wo es ihnen möglich ist T-Zellen zu stimulieren; nach [39]

Die klassische Abgrenzung unterteilt DC in zwei Subgruppen: Konventionelle myeloide und plasmazytoide DC (cDC und pDC). Die cDC nehmen Antigene in der Peripherie auf, wandern zu den T-Zellarealen und induzieren so Immunität. Charakteristisch für cDC ist das Expressieren der Oberflächenmarker CD11c, CD11b, CD13, CD45RO und CD33 [46]. Die pDC zirkulieren im Blut und können auch in lymphoidem Gewebe lokalisiert sein [47]. Die Hauptfunktion der pDC ist die Sekretion von Interferon- α als Antwort auf virale Infektionen und das Vorbereiten der T-Zellen auf virale Antigene [48]. Im Gegensatz zu cDC exprimieren pDC die Marker CD123, CD62L, CD45RA und CD36. Zusätzlich unterscheiden sich diese beiden Untergruppen auch in der Expression von einigen Chemokinrezeptoren, C-Typ-Lektin Rezeptoren und TLR [47]. Durch die spezifischen Rezeptoren erkennen beide Untergruppen unterschiedliche Pathogene und leiten so verschiedene Arten der erworbenen und adaptiven Immunabwehr ein [49].

Die Gruppe der DC beinhaltet somit heterogene Phänotypen, welche unterschiedlich innerhalb des Körpers verteilt sind, aber trotzdem einzigartige Fähigkeiten gemeinsam haben. Sie stammen von Vorläufern aus dem Knochenmark, welche über das Blut zu den peripheren Geweben migrieren und dort in einem unreifen Stadium verbleiben [30].

1.3.2. Langerhanszellen - LC

DC der Epidermis werden als LC bezeichnet. LC sind vor allem im *stratum spinosum* zu finden [50]. Sie wurden von Paul Langerhans 1868 mittels Goldchlorid-Färbungen entdeckt, jedoch zunächst den Nervenzellen zugeordnet [51]. Sie besitzen lange Dendriten und bilden ein flächiges Netzwerk in der Epidermis, welches die erste immunologische Barriere zur Außenwelt darstellt. Ihre Zugehörigkeit zu den DC wurde erst 1985 durch Schuler und Steinman propagiert [52]. LC sind eine Untergruppe der unreifen DC. Ihr Anteil an den epidermalen Zellen beträgt etwa 3-5% [53].

Morphologisch weisen sie eine Besonderheit auf: Die Birbeck-Granula [54]. Dies sind tennisschlägerförmige Zytoplasmagranula, welche eine Rolle bei endozytotischen Mechanismen und Antigenpräsentation spielen [55-57]. Die außerordentliche Fähigkeit, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren, wird durch eine Auswahl von endozytotischen Rezeptoren ermöglicht. Dazu gehören der CD207/Langerin [27] sowie CD1a (ehemals OKT6), der Fc- und Komplementrezeptor [26], Dectin-2 [58]. Auch Moleküle zur Zelladhäsion wie E-Cadherin und EpCAM werden exprimiert [59, 60]. Langerin selbst ist ein Transmembranprotein vom Lektin Typ C, das die Fähigkeit zur Mannosebindung besitzt. Internalisierte Antigene werden in den Birbeck Granula, die ein Teil des endosomalen Recycling Systems darstellen, akkumuliert und degradiert.

LC exprimieren das „*common leukocyte antigen*“ CD45; jedoch fehlt ihnen die Expression von typischen anderen linienspezifischen Antigenen wie z.B. CD3 (Lymphozyten), CD14 (Monozyten), CD16/56 (NK-Zellen), CD19 oder CD20 (B-Zellen) [50]. Verschiedene Marker humaner und muriner LC sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Der hämatopoetische Ursprung der LC ist lange bekannt. Bereits 1979 konnte im humanen Modell gezeigt werden, dass LC aus dem Knochenmark stammen und nach HSCT in der Haut persistieren können [61, 62]. Die Herkunft ihrer zirkulierenden Vorläuferzelle bleibt jedoch nach wie vor unklar.

Marker	Humane Haut		
	LC	Migrierende LC	
Langerin	+++	++	- Expression fehlt
Birbeck Granula	++	+	+ Geringe Expression
CD45	+	+	++ Mittlere Expression
MHC-Klasse II	++	+++	+++ Hohe Expression
CD11c	+	+	NB Nicht bekannt
CD1a	+++	+++	
E-Cadherin	++	+	
EpCAM	+	+	
CD205	-	-	
CD103	NB	NB	
CCR7	-	+	

Tabelle 1) Expression verschiedener Marker von LC und DC der Haut (epidermal: LC; dermal: migrierende LC, DC); nach [53]

Ein Auswandern kleiner Mengen LC aus der Haut findet regelmäßig im „*steady state*“ statt. LC können, wie auch andere DC, reifen und zu den Lymphknoten oder den SLO auswandern, indem sie durch Entzündung oder mikrobielle Stimulation dazu angeregt werden [63]. Nachdem lange Zeit angenommen wurde, dass LC der Prototyp der T-Zellaktivierenden DC seien, werden heute essenzielle Zusammenhänge in Frage gestellt. Besonders bei Infekten mit Herpesviren und der Kontaktallergie sind sie als Aktivatoren von T-Zellen nicht beteiligt. Es erfordert weitere Forschung, ob LC eine regulatorische Funktion besitzen, ob sie selbst das aufgenommene Antigen den T-Zellen präsentieren, oder ob sie es an lymphatische DC weitergeben [64]. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob fehlende LC durch hämatopoetischen Vorläuferzellen oder durch Proliferation ersetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass während inflammatorischer Prozesse, die Möglichkeit besteht LC aus zirkulierenden Monozyten zu rekrutieren [65].

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass unter normalen Umständen, kaum Vorläuferzellen in die Haut einwandern, sondern dass ruhende LC zur lokalen Expansion fähig sind [66, 67]. In Hauttransplantationsexperimenten konnte mittels Bromodeoxyuridin (BrdU) -Färbungen gezeigt werden, dass auch humane LC die Fähigkeit besitzen, die S-Phase einzuleiten und lokal zu proliferieren [68]. Die LC sind die meist untersuchte Gruppe der DC. Heute weiß man, dass ihnen eine besondere Rolle zukommt und sie eine einzigartige Funktion innerhalb der DC

besitzen.

1.3.3. Dermale dendritische Zellen - DDC

Die Rolle von dermalen dendritischen Zellen (DDC, engl. *dermal dendritic cell*), bei der Vermittlung von viraler Immunität der Epidermis, drängt sich in den Vordergrund der heutigen Forschung [69, 70]. DDC wurden, im Vergleich zu den LC, relativ spät entdeckt [71, 72]. Ihre Charakterisierung ist nicht weit fortgeschritten, da dafür bislang spezifische Marker fehlen. DDC differenzieren aus Makrophagen oder DC-Vorläufern und stammen aus dem Knochenmark. Im murinen System machen sie 60% der dermalen Zellen aus, während eine quantitative Analyse beim Menschen bislang aussteht [24]. Es wird angenommen, dass die Expression von MHC-Klasse II, CD11c, CD36, CD205, CD206, CD209 und Faktor XIIIa die DDC von Makrophagen unterscheidet, wobei alle aufgeführten Marker unter Umständen auch von Makrophagen exprimiert werden können [73, 74]. Auch die Expression von CD14 oder CD1a, welche typisch für Monozyten bzw. LC ist, konnte in dermalen Zellen nachgewiesen werden [75, 76].

In Mäusen konnte eine Population von CD207 positiven DDC charakterisiert werden, welche 20% der murinen DDC ausmachen und im Gegensatz zu LC das Integrin CD103 exprimieren [77, 78].

Die Homöostase der DDC in der Dermis scheint denen der LC zu ähneln. Sowohl in der Maus als auch im Menschen konnte im Grundzustand eine leichte Proliferation nachgewiesen werden. Auch das Vorhandensein einer noch undefinierten Vorläuferzelle verbindet diese beiden Zelltypen [74].

DDC migrieren früher als LC zu den Lymphknoten und kolonisieren dort unterschiedlich. Außerdem sind sie fähig, B-Zellen zu stimulieren, was LC nicht möglich ist [64]. Trotz der unterschiedlichen Funktionen ist die Wichtigkeit der DDC, verglichen mit LC, weiterhin unklar. Die Kapazität beider Zellpopulationen zur Stimulation und Inhibition von T Zellen bleibt kontrovers und bis heute gibt es nur wenig vergleichende Studien.

1.4. HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION

Die HSCT ist der Prozess der Transfusion von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Wenn die Stammzellen vom Empfänger selbst stammen, handelt es sich um eine autologe Transplantation. Stammen sie von einem zweiten Individuum, spricht man von einer allogenen Transplantation. Die Wahl der Stammzellquelle orientiert sich am Nutzen-Risiko-Profil des Spenders und Empfängers. Die periphere Blutstammzellgewinnung, mobilisiert durch G-CSF (engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), kommt derzeit am häufigsten zur Anwendung.

Diese Form der medizinischen Therapie wird bei Menschen eingesetzt, welche maligne Erkrankungen der Blutbildung oder vererbte bzw. erworbene Blutanomalien aufweisen. Vor einer HSCT erhalten die Patienten eine Konditionierung. Diese besteht aus Chemotherapie und/oder Bestrahlung des Körpers (TBI, engl.: *total body irradiation*). Sie dient der Immunsuppression, um Platz für das folgende Transplantat zu schaffen und ihm die Möglichkeit zu geben, anzuwachsen. Zusätzlich dient es der Zerstörung von malignen Zellen. Der Patient erhält anschließend eine Infusion von Spender-Stammzellen, welche ein gesundes Immun- und Blutbildungssystem herbeiführen sollen. Somit ist das Ziel, einen vollständigen Wechsel der Hämatopoese von Empfänger zu Spender zu erreichen. Die Behandlung beinhaltet auch Risiken wie konditionierungsinduzierte Toxizität und das auftreten von GvHD (engl.: *Graft-versus-Host-Disease*).

Neue Studien versuchen, die Therapie zu optimieren bzw. sie auch Patienten zukommen zu lassen, für welche eine konventionelle Transplantation aufgrund des Alters oder Vorerkrankungen nicht in Frage käme [79].

So wird aktuell die Intensität der Konditionierung (Bestrahlung oder Medikamente) reduziert (RIC, engl.: *reduced irradiation conditioning*) um das Risiko zu senken. T-Zellen werden *in vivo* durch einen Antikörper depletiert und ein CD8 freies Transplantat infundiert. So soll das Risiko der Entstehung von GVHD minimiert werden. Um das Immunsystem vollständig zu rekonstituieren, erhält der Patient nach einigen Wochen Donorlymphozyten (DLI, engl.: *donor lymphocyte infusion*) [80]. Auf diese Weise kann der positive Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (GvL, engl.: *Graft-versus-Leukemia*) erhalten bzw. erhöht werden.

Die HSCT bleibt eine riskante Prozedur mit vielen Komplikationen. Der Erfolg hängt davon ab, ob die Transplantat-bedingte Morbidität und Mortalität reduziert werden

kann, der GvL-Effekt aber erhalten bleibt. Ziel ist es die Therapie von einer aggressiven zu einer individualisierten, risikooptimierten Form zu entwickeln.

1.5. GRAFT VERSUS HOST DISEASE - GVHD

Die GvHD ist eine lebensbedrohliche Komplikation nach allogener HSCT und einer der Hauptgründe für Mortalität und Morbidität. Als GvHD wird eine immunologische Reaktion der immunkompetenten T-Lymphozyten des Spenders gegen gesunde Zellen des Empfängers bezeichnet. Die GvHD kann in mehr oder minder starkem Ausmaß auftreten, selbst wenn die HLA-Typisierung eine große Übereinstimmung zwischen Patient und Spender ergeben hat.

Patienten, welche mit einem HLA-identischen Transplantat eines Geschwisterspenders transplantiert werden, entwickeln in ca. 30-60% eine leichte bis mittelschwere GvHD. Bei 10% kann ein schwerer klinischer Verlauf folgen. GvHD ist für eine indirekte Mortalitätsrate von bis zu 50% verantwortlich [81].

Bereits 1966 wurden drei Voraussetzungen zur Entstehung der GvHD definiert, die heute noch als gültig bezeichnet werden können: 1) Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten; 2) der Empfänger muss das Transplantat als fremd erkennen, er darf es aber nicht abstoßen, und 3) der Empfänger muss Antigene exprimieren, welche im Spender nicht vorkommen [82]. Hauptsächlich richten sich die im Transplantat enthaltenen T-Lymphozyten eines Spenders gegen den Empfängerorganismus.

Am häufigsten sind Haut, Darm, Leber und Auge [83] von einer GvHD betroffen. Die genannten Organe weisen eine hohe Dichte von DC auf und besitzen somit ein gesteigertes immunologisches Potential [84, 85]. Die Haut ist in 90% aller Fälle betroffen. Es entwickelt sich ein makulopapulöses Exanthem und Erythrodermie. Hautschädigungen sind oft die ersten Anzeichen einer akuten GvHD und treten meist in den ersten 2-6 Wochen nach HSCT auf. Histologische Zeichen der Haut-GvHD sind Apoptose der Keratinozyten, inflammatorische Infiltrate und Endothelschädigungen [86].

Die GvHD ist oft schwer zu diagnostizieren, da klinische Zeichen und Symptome oft auch Medikamenten- oder virusinduziert sein können. Auch können Gewebsschädigungen durch die vorangegangene Bestrahlungstherapie erfolgen [87, 88].

1.5.1. Pathomechanismus der GvHD

Von Ferrara et. al. wurde 2009 ein aktualisiertes Modell für den Pathomechanismus der Entstehung der GvHD veröffentlicht [89]. Das Dreiphasenmodell gliedert sich in folgende Schritte: 1) Schaden durch Konditionierung, 2) Aktivierung von Donor T Zellen und 3) Effektorphase. In der ersten Phase wird durch die Konditionierung des Patienten (RIC, TBI oder Chemotherapie) eine Gewebsschädigung verursacht, welche zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS) führt. In diesem Milieu nehmen APC Antigene auf und werden durch die Zytokinfreisetzung aktiviert. Sie reifen aus und exprimieren MHC Moleküle, welche das Antigen den Donorlymphozyten in der zweiten Phase präsentieren. So können diese Donorlymphozyten aktiviert werden, produzieren Interferon (IFN), Interleukin 1 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α). Dies führt zu T-Zellproliferation und Expansion und wird gefolgt von der dritten Phase, der Generierung zytotoxischer Prozesse und Organschädigung (Abb.3).

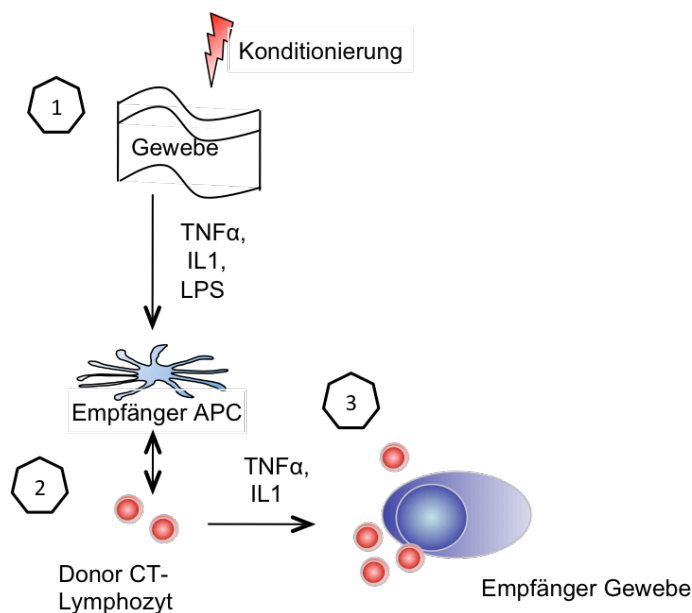


Abbildung 3) Pathomechanismus der GvHD. **1** Durch Konditionierung des Empfängers Gewebsschädigung und Freigabe von Zytokinen und LPS. Daraufhin Aufnahme der LPS durch Empfänger APC. **2** Aktivierung der APC und Stimulation der Spender CTL. **3** Expansion der CTL und folgende Organschädigung beim Empfänger; Nach [89]

In allen Phasen der GvHD spielen DC eine kritische Rolle. Sie beeinflussen die Qualität und Quantität der entstehenden Immunreaktion im Empfänger [90, 91].

1.5.2. APC und GvHD

Die akute GvHD wird durch T-Zellen des Spenders vermittelt, die durch APC / DC des Empfängers aktiviert wurden [92]. Antigene, die von den T-Zellen spezifisch erkannt werden, können HLA-Moleküle sein, wenn Spender und Empfänger nicht HLA-identisch sind. Darüber hinaus werden Antigene erkannt, welche nicht HLA-kodiert sind. Diese Antigene werden auch als Minor-H-Antigene bezeichnet. In der späten Phase nach Transplantation können die Spender T-Zellen auch durch Antigene auf den Spender DC aktiviert werden. Dies geschieht z.B. nach Phagozytose von Patientenzellen über HLA-Klasse-II oder auf dem Weg der Cross-Präsentation über HLA-Klasse-I.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass LC sowie DC der Milz in der Lage waren, T-Zellen zu aktivieren, wohingegen andere APC dies nicht vermochten [93, 94]. Somit ist die Bedeutung der verschiedenen DC während Induktion und Prolongation der GvHD von zentralem Interesse. Lokale APC, wie z.B. LC, sezernieren Zytokine und aktivieren so einige Subgruppen der T-Lymphozyten [49]. Bereits 1986 wurde eine schnelle Rekrutierung von T-Zellen in die von einer akuten GVHD betroffenen Organe beschrieben [95].

Es ist allgemein bekannt, dass Bestrahlung und Chemotherapie die Mehrheit der DC im Empfänger depletiert. Diese werden nach der HSCT durch Spender DC ersetzt. Die Kinetiken dieser Prozesse verlaufen unterschiedlich und hängen von der Art der Konditionierungstherapie ab [96]. Beim Wechsel von gewebständigen DC des Empfängers zum Spender scheint es sich um einen sehr komplexen Prozess zu handeln und es wird vermutet, dass bestrahlungsresistente Vorläuferzellen dabei eine Rolle spielen [97, 98]. Die Haut enthält somit während des Prozesses des Anwachsens, eine Mischung aus Empfänger und Spender DC, welche jeweils einzigartige Rollen im Kontext der GvHD Pathogenese spielen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Geräte

Autoklav	KSG Sterilisatoren (Olching)
System V-150	System GmbH (Wettenberg)
Brutschrank Typ 038 B	Horo, Dr. Hofmann (Ostfildern)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Langenselbold)
Dampfgarer	Tevion (Seefeld)
Digitales Hochleistungs-FireWire-Kamerasystem für Mikrofotografie mit hoher Bildauflösung DFC 480	Leica (Bensheim)
Digitalkamera: EXILIM 7,2 MP	Casio (Norderstedt)
Durchflusszytometer Canto™ mit Software Diva™	BD Biosciences (Heidelberg)
Einbettkonsole mit Kühlplatte (Tissue-Tek)	Sakura (Staufen)
Eismaschine UBE50/35	Ziegra (Isernhagen)
Feinwaage, 0,05-210 g	Sartorius (Göttingen)
Feuchtekammer	neoLAB (Heidelberg)
FlexCycler	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Gefrierschrank -80°C Hera freeze	Heraeus/Kendro (Langenselbold)
Kühl- und Gefrierkombinationen 4 °C, -20 °C	Privileg (Fürth)
Magnetrührer mit Heizplatte	Variomag Mono (München)

Nanodrop 2000c	Thermo Fischer (Braunschweig)
Objektträger-Strecktisch	Typ 12801 Medax (Kiel)
Paraffinstreckbad	Typ WB24 Medax (Kiel)
Peristaltik-Pumpe (LKB-Pump P-1)	Pharmacia (Uppsala, S)
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
pH-Meter 761 (Calimatic)	Knick (Berlin)
Pipettierhilfe PipetBoy	IBS Integra Biosciences VWR (Darmstadt)
Mikroliterpipetten Transferpette R S	Brand (Wertheim)
0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	
Mehrkanalpipetten 5-50µl, 25-200µl	Brand (Wertheim)
Rasierer	BaByliss (Düsseldorf)
Rotationsmikrotom Leica RM 2245	Leica (Nussloch)
Rotlichtlampe Typ: IR 11.00	Petra (Burgau)
Schüttelgerät, Lab Dancer	VWR (Darmstadt)
Sterile Werkbank HERAsafe Typ HS 18	Kendro (Hanau)
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370,	MVE Europe (Solingen)
Air liquide Espace 331,	Tec Lab (Königstein)
Stickstoff-Tank Taylor-Wharton XL-180	Tec Lab (Königstein)
Tischabzug - Benchtype Fume Adsorber	TAZ 19 Medite (Burgdorf)
Vakuum Gewebe-Infiltrationsautomat	Sakura (Staufen)
Tissue-Tek RVIPTM 5 Jr.	
Vortex MS2 Minishaker	IKA (Staufen)
Waage Sartorius (BA 2100 S) 0,5 g-2100 g	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage Milli-Q plus	Millipore (Eschborn)
Purelab classic	Elga-Berkefeld GmbH (Celle)
Confocal LSM 510-UV	Zeiss (Oberkochen)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen) Kendro-Heraeus (Langenselbold)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Cellstrainer	BD Falcon
Einbettkapseln für Paraffin	NeoLab (Heidelberg)
Einfrierboxen	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchen Cryotube 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)
Einmalpipetten, steril	Greiner (Nürtingen)
1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	
Eisbad	NeoLab (Heidelberg)
Fettstift (Super Pap Pen)	Beckmann Coulter (Frankreich)
FACS-Röhrchen zur Durchflusszytometrie	BD Biosciences Europe (Erembodegem, B)
BD Falcon	Roth (Karlsruhe)
FACS-Röhrchenständer	Deltalab (Barcelona, S)
Gewebeeinbettsschwamm	Greiner (Nürtingen)
Gewebekulturplatten	
24-, 48- und 96-Loch- Gewebekulturplatten	
Handschuhe	Semperid (Österreich)
Insulinspritzen	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,3 ml - 30 G - 8mm	neoLAB (Heidelberg)
Kasten für Objektträger, mit Verschluss	Greiner (Nurtingen)
LeucoSep-Röhrchen 50 ml	NeoLAB (Heidelberg)
Magazin für Einbettkassetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Messzylinder Plastik	
25 ml, 100 ml, 1000 ml	
Mikrotiterplatten	Greiner (Nürtingen)
Flach-, Rund- und V-Bodenplatten im 96- Lochformat	
Mikrotomklinge Typ A35	Feather (Japan)
Nahtmaterial	Ethicon (Norderstedt)
Ethibond Excel 5 - 0; 75 cm	
Paraffin (Kliniplast)	Klinika Medical (Usingen)
Petrischalen	Greiner (Nurtingen)
Ø 94 mm, 60 mm, 35 mm	

Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	
Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf (Hamburg)
200, 500 und 1500 µl	
Spritzen	Braun (Melsungen)
10, 20 und 50 ml Einmalspritzen	
Sterilfilter	Schleicher&Schuell (Dassel)
FP30/0,2 CA-S, FP30/0,45 CA-S, FP30/1,2 CA-S	SteritopTM, Millipore (Eschborn)
Tissucol Duo S	Immuno Baxter (Unterschleißheim)
Cuticell Weichparaffinwundgaze	BSN Medical (Hamburg)
Zellkulturflaschen	Greiner (Nürtingen)
25, 80 und 175 cm ² Kulturfläche	
Zellkultur-Röhrchen, PP	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
15 ml und 50 ml	
Zellkultur-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)

2.1.3. Glaswaren

Bechergläser	Schott (Mainz)
200, 500 und 1000 ml	
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)
24x32 mm	
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)
24x50 mm	
Duran-Glasflaschen	Schott (Mainz)
500, 1000, 2000 und 5000 ml	
Glasküvetten groß mit Deckel	Carl Roth (Karlsruhe)
Objektträger SUPERFROST PLUS	Menzel (Braunschweig)
25x75 mm	
Objektträger, geputzt	Diagonal (Münster)
25x75 mm	
Zählkammern	Schreck (Hofheim)
Fuchs-Rosenthal	

2.1.4. Operationsbesteck

Scheren

Kat. Nr. 14054 - 13 gerade, scharfe, vorne abgestumpfte Klinge 13 cm

Kat. Nr. 14068 - 12 gerade Klinge 12 cm

Kat. Nr. 14088 - 10 gerade Klinge 10; 5 cm

Kat. Nr. 14080 - 11 Arterienschere mit Kugelkopf (1; 5mm) 11; 5 cm

Kat. Nr. 14001 - 12 gerade, scharfe, vorne abgestumpfte Klinge 12 cm

Klemmen

Kat. Nr. 13008 - 12 gerade Klemme 12; 5 cm

Pinzetten

Kat. Nr. 11050 - 10 gerade Pinzette 10 cm

Kat. Nr. 11052 - 10 Pinzette mit gebogener, gezahnter 0; 8mm Spitze 10 cm

Kat. Nr. 11002 - 12 gerade Pinzette 12 cm

Alle bezogen über FST-Fine Science Tools (Heidelberg).

2.1.5. Chemikalien

Aceton	Merck (Darmstadt)
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma (Deisenhofen)
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovativ (Hamburg)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
DMF (Dimethylformamid)	Merck (Darmstadt)
EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)	Sigma (Deisenhofen)
EDTA Disodiumsalz, Titriplex R III	Merck (Darmstadt)
Eich-Pufferlösungen	neoLAB (Heidelberg)
pH 4, pH 7, pH 10	
Eisessig (Essigsäure > 95%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (70%)	Brüggemann Alkohol (Heilbronn)
Ethanol reinst	Merck (Darmstadt)
Ethylalkohol (Ethanol 96% vergällt)	M & W Mundo (Mainz-Kostheim)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Roti-Histofix, 4,5% Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Fluka (Deisenhofen)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Kaliumchlorid	Applichem (Heidelberg)
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA (Pasching, A)
Meyers Haemalaun Lösung	Merck(Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Serva (Heidelberg)
Natronlauge (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Applichem (Heidelberg)
PBS (phosphate-buffered saline), flüssig	Gibco BRL (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
TRIS PUFFERAN	Carl Roth (Karlsruhe)
Reinigungslösung für Elektroden	neoLAB (Heidelberg)
Tris	Applichem (Heidelberg)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)

Tween20 (Detergens)	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Vectashield mounting medium	Axxora (Lörrach)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt)
Xylol reinst (Isomerengemisch)	Merck (Darmstadt)
Zitronensäure – Monohydrat	Merck (Darmstadt)

2.1.6. Medikamente, Medien und Zusätze

Albumin, bovine serum	Sigma (Deisenhofen)
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen)
AIM-V™ Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
Antibody Diluent	LabLine (Hamburg)
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer (Leverkusen)
Bepanthen Wund- und Heilsalbe	Bayer (Leverkusen)
Borgal 24%-Injektionslösung	Virbac (Bad Oldesloe)
BSA (<i>bovines serum albumin</i>)	Sigma (Steinheim)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Invitrogen (Schottland, UK)
Dispase 2	(Roche, Mannheim)
EBSS (Earl's balanced salt solution)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Entellan Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma (Steinheim)
FCS (engl.: <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum)	PAA (Pasching, A)
Fluconazol (2mg / ml)	Hikma (Klein-Winternheim)
Geneticin (G418)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Gentamicin (40mg / ml)	Ratiopharm (Ulm)
Ketamin (50mg / ml)	Ratiopharm (Ulm)
L-Glutamin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Heparin (Liquemin)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Humanalbumin	Octapharm (Langenfeld)
Oligopeptide	Biomers.net (Ulm)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Karlsruhe)

PHA (Phytohämagglutinin)	Murex Biotech Ltd. (Kent, UK)
RPMI 1640, flüssig	Gibco BRL (Karlsruhe)
Taq Polymerase	Quiagen (Hilden)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL (Karlsruhe)
X-VIVO15 T-Zellkulturmedium	Biowhittaker (Viersen, B)

Humanserum (HS) für die T-Zellkultur wurde aus dem Blut gesunder Spender durch Abserung in der Blutbank des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Das Serum von zehn bis zwanzig Spendern wurde gemischt und 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

2.1.7. Zytokine

Interleukin 1 β (IL-1 β)	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
Interleukin-2 (IL-2); Proleukin	Chiron Behring GmbH & Co (Marburg)
Interleukin-4 (IL-4)	R&D Systems (Wiesbaden)
Interleukin 6 (IL-6)	Miltenyi (Bergisch-Gladbach)
GM-CSF (engl. <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)	Bayer (Leverkusen)
TNF- α	Promokine (Heidelberg)
Prostaglandin E2 (PGE ₂)	Sigma (Deisenhofen)

2.1.8. Zellkulturmedien

Für die Zellkultur wurde RPMI 1640-Medium und AIM-V Medium verwendet.

Vor Gebrauch wurde 1% Penicillin/Streptomycin und je nach Zelltyp hitzeinaktiviertes FCS oder Humanserum zugesetzt. RPMI 1640 mit 1% Penicillin/Streptomycin wird im Folgenden RPMI genannt, mit Penicillin/Streptomycin und x% Serum wird es als RPMI x%FCS bzw. RPMI x%HS bezeichnet.

Für die T-Zellkultur wurde AIM-V™ Medium verwendet, welches mit 10% Humanserum ergänzt wurde (AIM-V_{10%HS}).

DC-Medium: RPMI _{2%HS}

Präp-Medium: RPMI _{2%FCS}

T-Zellmedium: AIMV _{10%HS}

Hautkulturmedium: AIMV _{1%HS} + 40µg/ml Fluconazol

Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Einfriermedium

X-VIVO15 bzw. AIM-V

Humanalbumin 8%

Heparin (Liquemin) 10 IU/ml

Für die Kryokonservierung wurde kurz vor der Verwendung DMSO zu 10% frisch zugesetzt.

2.1.9. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung bei 4°C.

Acetatpuffer für ELISpot-Assays	H ₂ O	46,9 ml
	Essigsäure 0,2 N	4,6 ml
	Natriumacetat 0,2 N	11,0 ml
AEC (Substratlösung)	1x (3-Amino-2-Ethyl-Carbazol)-Tablette	
	Dimethylformamid	2,5 ml
	Acetatpuffer	ad to 50 ml

Um mögliche Feststoffe zu beseitigen, wurde diese Lösung durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

Blocking-Puffer	BSA (20%ig)	2,5ml
	Humanalbumin	5g
	TBS	100ml
Lagerung bei 4°C		
Citrat-Puffer		
Stammlösung A	Zitronensäure	0,1M
	H ₂ O	ad 1 L
Stammlösung B	Natriumcitrat	0,1M
	H ₂ O	ad 1 L
<u>Arbeitslösung</u>	Lsg A	9 ml
	Lsg B	41 ml
	H ₂ O	ad 500 ml
		pH 6, 1
Lagerung bei 4°C		
Dispase Medium	Dispase	4,8 mg/ml
	FCS	10µl/ml
	Penicillin/Streptomycin	10U/100µg /ml
EDTA-Puffer	Disodiumsalz	0,375 g
	H ₂ O	ad 1 L
		pH 8,0
Lagerung bei RT		
Eosin-Färbelösung	EosinY	100 ml
	Eisessig	0,5 ml
Lagerung bei RT		
FACS-Puffer	PBS	500 ml
	0,5% BSA	250 mg
Lagerung bei 4°C		
Hautlagermedium	EBSS	500 ml
	Gentamicin	50 µg / ml
	Fluconazol	40 µg / ml
	Penicillin/Streptomycin	40 U / ml
		40 µg / ml
Lagerung bei 4°C		

Hämalaun-Färbelösung	Meyers Hämalaun	50 ml
	Aqua dest	200 ml
Lagerung bei RT		
MACS-Puffer	PBS	500 ml
	0,5 % BSA	250 mg
	2 mM EDTA	
Lagerung bei 4°C		
Narkose	Xylazin (Rompun 2%)	0,8 ml
	Ketamin (50 mg/ml)	2 ml
	H ₂ O	2,8 ml

Eingesetzt wurden 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 62,5 mg/kg Körpergewicht Ketamin. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g pro Tier entspricht dies 80 µl. Lagerung max. 14 Tage bei 4°C

TBS (tris-buffered saline) 20x	KCl	4,0 g/L
	NaCl	160 g/L
	Tris	60 g/L
		Ph 7,4
Lagerung bei RT		
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0 g
	H ₂ O	ad 1 L
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung	75 ml
	150 mM NaCl	25 ml
Lagerung bei RT		
Tris-Puffer (Stammlösung 10x)	TRIS PUFFERAN	60,5g
	H ₂ O	ad 600 ml
		pH 7,6
	NaCl	90 g
	H ₂ O	ad 1 L
Lagerung bei RT in dunkler Glasflasche.		
Tris-Puffer (Gebrauchslösung)	Stammlösung	100 ml
	H ₂ O	ad 1 L
		pH7,6

Lagerung bei RT

2.1.10. Antikörper

2.1.10.1. Antikörper für die Immunhistochemie

Alle Antikörper wurden aliquotiert bei -20°C gelagert und nach Anbruch bei 4°C aufbewahrt.

2.1.10.2. Monoklonale Antikörper (mAK)

Spezifität	Klon	Isotyp	Vorbehandlung	Verdünnung	Bestellnr.	Hersteller
anti CD1a	010	IgG1	EDTA	1:100	M3571	D
anti CD3	LN10	IgG1	EDTA	1:100	NCL-L- CD3-565	N
anti CD11c	5D11	IgG2a	EDTA	1:100	NCL-L- CD11c-563	N
anti CD207	12D6	IgG2b	EDTA	1:100	NCL- LANGERIN	N
anti Ki67	MIB-1	IgG1	EDTA	1:250	M 7240	D
anti HLA-DR	LN-3	IgG2b	keine	1:50	NCL-LN3	N

Tabelle 2) Übersicht der verwendeten mAK in der IHC D=Dako, Hamburg; N=Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK

2.1.10.3. Polyklonale Antikörper (pAK)

Spezifität	Klon	Spezies	Vorbehandlung	Verdünnung	Bestellnr.	Hersteller
anti CD207	CLEC4K	Rabbit	EDTA	1:300	SP7357P	A

Tabelle 3) Übersicht der verwendeten pAK in der IHC A=Acris Antibodies Herford

2.1.10.4. HLA-allelspezifische monoklonale Antikörper im ELISpot-Assay

Um HLA-Restriktionsuntersuchungen im IFN- γ -ELISpot-Assay (engl.: *enzyme-linked immunosorbent spot*) durchzuführen, wurde in dieser Arbeit der HLA-spezifische mAK W6/32 verwendet. Dieser ist ein murines Immunglobulin (IgG), welches spezifisch humane HLA-Klasse-I-Moleküle erkennen und binden kann. Als Isotypkontrolle dienen Antikörper mit irrelevanter Spezifität und dem selben Isotyp. Für die Anwendung im ELISpot wurden positiv auf Bindung getestete aufgereinigte Hybridom-Überstände verwendet. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte in PBS bei -20 °C.

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Literatur
W6/32	HLA-Klasse-I	IgG2a	Parham et al, 1979
HB55	HLA-DR	IgG2a	Lampson & Levy, 1980
GAP.A3	HLA-A3	IgG2a	Berger et al, 1982

Tabelle 4) Übersicht der verwendeten HLA-spezifischen mAk W6/32 und des als Isotyp verwendeten mAk

2.1.10.5. Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchflusszytometrie

Folgende Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie verwendet (Tab.5):

Bezeichnung	Spezifität	Konjugation	Hersteller
CD45	Mouse	○	Beckman Coulter
HLA-DR	Mouse	●○	Beckman Coulter
CD1a	Mouse	■○	Beckman Coulter
CD3	Mouse	●	Beckman Coulter
CD8	Mouse	■	Beckman Coulter
IgG	Mouse	○●■	Beckman Coulter

Tabelle 5) Übersicht der verwendeten Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen. Konjugationen: ○ Fluoreszeinisothiocyanat (FITC); ● Phycoerythrin (PE); ■ Allophycocyanin (APC)

2.1.11. ELISpot

Anti-hIFN- γ -Antikörper #1-D1K (Maus-IgG)	Mabtech AB (Nacka, S)
Anti-hIFN- γ -Antikörper #7-B6-1 (Maus-IgG), biotinyliert	Mabtech AB (Nacka, S)
ELISpot-Gerät Axio Imager M.1	Zeiss (Jena)
Klebefolie zum Ablösen der Nitrozellulosemembran	Millipore (Eschborn)
KS ELISpot-Software Version 4.9	Zeiss (Jena)
Multiscreen 96-well Filtration Platte (mit Nitrozellulosemembran)	Millipore (Eschborn)

2.1.11.1. Automatische Auswertung

Für die Auswertung der IFN- γ -ELISpot-Experimente wurde ein automatisches Auswertesystem (KS ELISpot-System Version 4.9 der Firma Zeiss, Jena) eingesetzt. Dieses Messverfahren besteht aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofokus. Der Motortisch kann jede einzelne Testeinheit (TE) der ELISpot-Platte präzise ansteuern. Die vom Mikroskop erfassten Zytokinspots wurden von einer angeschlossenen Farbkamera aufgenommen und digitalisiert. Anschließend konnte das Ergebnis durch die KS ELISpot-Software ausgewertet werden [99].

2.1.12. Kits

Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution Dako (Hamburg)

REF: S2023

Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse

REF: K5007 beinhaltet: Dako (Hamburg)

Dako REAL™ EnVision™/HRP Rabbit/Mouse (ENV)

Dako REAL™ Substrate Buffer

Dako REAL™ DAB+ Chromogen (X50)

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse

REF: K5005 beinhaltet: Dako (Hamburg)

Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)

Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)

Dako REAL™ Chromogen Red 1

Dako REAL™ Chromogen Red 2

Dako REAL™ Chromogen Red 3

Dako REAL™ AP Substrate Buffer

Dako REAL™ Levamisole

NucleoSpin Tissue Kit

Machery & Nagel
(Düren)

Vectastain Elite Kit

Vector Lab
(Burlingame, US)

2.1.13. Zelllinien und Blutlymphozyten

2.1.13.1. Blutlymphozyten von Patienten und Spendern

In dieser Arbeit wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) verwendet, welche von den Hautspendern oder aus Routine-Blutspenden der Transfusionszentrale des Universitätsklinikums Mainz gewonnen wurden. Aus einer 450 ml Vollblutspende wurden dort sogenannte Leukozytenfilme oder „buffy coats“ maschinell abgetrennt und zur Verfügung gestellt. Diese enthalten Leukozyten, aus denen durch Ficoll-Separation die Lymphozyten isoliert werden können. Von Hautspendern wurden 50-70ml Vollblut zur Isolation verwendet.

2.1.13.2. K562-Zellen und HLA-Transfektanten

K562 ist eine Zelllinie, welche ursprünglich aus einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie stammt [100]. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie keine HLA-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Sie stellen somit ein Ziel für NK-Zellen dar [101]. Für die Charakterisierung der „Mismatch“-Reaktivität von einer der generierten T-Zelllinien wurde eine K562-Transfektante eingesetzt, die stabil mit HLA-A*0201 transfiziert worden war. Diese K562-Transfektante wurde von Herrn Prof. T. Wölfel (Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt [102].

2.1.14. Versuchstiere

Für alle Experimente wurde die NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ Maus, auch bekannt als NOD scid gamma Maus (NSG) verwendet. Die Tiere wurden über das Jackson Laboratory in Bar Harbor (MA, USA) bezogen (Stock Nummer 005557). Die Haltung und Manipulation der Tiere erfolgte in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF (engl.: *specific pathogen free*) Bedingungen. Dem autoklavierten Trinkwasser wurde zusätzlich 0,08 mg/ml Borgal (Sulfadoxinum, Trimethoprim) zugesetzt. Es lag folgender genehmigter Tierversuchsantrag vor: "Einfluss verschiedener Effektor T Zell-Subpopulationen auf murine Entzündungsmodelle (experimentelle kutane

Leishmaniosis, Kontaktallergie, allergisches Asthma) Erweiterung durch Hauttransplantationen, Beginn: 12.06.2008, Aktenzeichen der Genehmigung durch Landesuntersuchungsamt: 23 177-07/G 08-1-010, Antragstellerin: Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz.

2.1.15. Mausstamm

Die NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (auch NOD-scid IL2R^{null}, NSG) Maus kombiniert die Vorteile des NOD/ShiLtJ (engl.: *Non-Obese Diabetic*) Hintergrunds mit der scid Mutation (engl.: *severe combined immune deficiency*). Dies bedeutet für die NOD Mutation Defekte in immunoregulatorischen Funktionen von APC, in der Regulation des T-Lymphozyten Repertoires, Defekte der NK-Zell Funktion und in der Zytokinproduktion von Makrophagen [103]. Die SCID Mutation beruht auf einem Defekt des Gens, welches für das Rearrangement des antigenspezifischen Rezeptors von Lymphozyten codiert. Diese Mutation führt zum Fehlen von funktionalen T- und B-Zellen. Somit ist es dem Tier nicht möglich fremdes Gewebe abzustößen [104, 105].

Die NSG Maus besitzt zusätzliche einen Defekt in der gamma Kette des IL-2 Rezeptors. Somit ist diese Maus stark immunsupprimiert. Ihr fehlen reife T- und B-Zellen, funktionelle NK-Zellen und verschiedene zytokinabhängige Signalwege, da die gamma Rezeptorkette ein Bestandteil verschiedener Interleukinrezeptoren (auch IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21) ist.

Im Vergleich zu anderen NOD/SCID-Stämmen zeichnet sich die beschriebenen NSG-Maus durch eine deutlich erhöhten Lebenserwartung und ein gutes Anwachsen humaner Zellen aus [106, 107]. Sie entwickelt kaum thymische Lymphome und ist widerstandsfähig gegenüber Gammastrahlung. Dieser Stamm ist aufgrund seiner Eigenschaften optimal geeignet, um xenogene Organe ohne eine unerwünschte Abstoßungsreaktion zu transplantieren.

2.2. METHODEN

2.2.1. Zellkultur

Die Kultur eukaryontischer Zellen erfolgte nach Standardmethoden [108]. Es werden hier nur Besonderheiten und Abweichungen der Standardprotokolle aufgeführt. Alle Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen bearbeitet, d. h. an einem sterilen Arbeitsplatz unter Verwendung steriler Materialien. Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

2.2.2. Isolation von peripheren mononukleären Blutlymphozyten

Aus peripherem Blut oder „*buffy coats*“ wurden die PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden LeucoSep-Röhrchen mit 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium beladen, das Medium unter die Fritte zentrifugiert und bis zu 30 ml Blut auf die Fritte der Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1000 x G (20 min bei Raumtemperatur) ohne Bremse befanden sich die Blutlymphozyten in der Interphase oberhalb des Lymphozyten-Separationsmediums und konnten mit einer Pipette vorsichtig abgenommen werden. Danach wurden sie zweimal mit RPMI gewaschen, bevor sie gezählt und in 20 bis 50 x 10⁶-Portionen kryokonserviert wurden. Im Fall einer anschließenden Isolation von Lymphozyten-Subpopulationen wurden die Zellen direkt mit dem gekühlten Isolationspuffer (MACS-Puffer) gewaschen.

2.2.3. Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Die Generierung von reifen DC wurde nach Protokoll von Dauer et. al. [109] durchgeführt. PBMC aus dem Blut von Hautspendern oder „buffy coats“ wurden wie beschrieben gewonnen. Um nun die enthaltenen Monozyten zu isolieren, wurden die Zellen auf eine 6-Loch-Platte in der Konzentration von $10\text{-}15 \times 10^6$ in 3 ml FCS_{2%HS} gegeben und für 45 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Die Monozyten haften nach dieser Zeit an der Platte und die überschüssigen Zellen konnten durch dreimaliges Spülen mit warmem PBS (RT) entfernt werden. Das Ausreifen der Monozyten erfolgte durch Zugabe von 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 in 3ml Medium RPMI _{2%}. Nach 24 Stunden wurden 1000 U/ml TNF- α , 10ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml IL-6, und 1 μ M/ml PGE2 zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden konnten reife dendritische Zellen durch dreimaliges spülen mit kaltem PBS (4°C) geerntet und portioniert kryokonserviert werden.

2.2.4. Isolation von CD8 positiven T-Zellen

Für die Isolation von CD8 positiven T-Zellen wurden PBMC mit CD8-MicroBeads (nach Protokoll: CD8-MicroBeads, Miltenyi Biotec) inkubiert. Die MicroBeads bestehen aus kleinen paramagnetischen Partikeln, welche an murine Anti-human CD8-Antikörper gekoppelt sind und somit ausschließlich humane CD8 positive Lymphozyten binden. Die so an MicroBeads gebundenen Zellen wurden über eine magnetisierte Separationssäule, je nach Zellzahl: MS- oder LS-MACS (engl.: *magnetically activated cell sorting*), gegeben und auf der Säule gehalten. CD8 negative Zellen wurden nicht an die Säule gebunden und als CD8-Negativfraktion aufgefangen. Nach Entmagnetisierung der Separationssäule wurden die CD8 positiven T-Lymphozyten mit einem Stempel und Puffer von der Säule eluiert und durch mehrmaliges Waschen weitgehend von ungebundenen MicroBeads getrennt.

2.2.5. Stimulation von Lymphozyten in der Kultur mit dendritischen Zellen

Die MLDC (engl.: *mixed lymphocyte dendritic cell culture*) wurde verwendet um isolierte CD8 positive T-Zellen mit ausgewählten DC zu stimulieren. Dabei proliferieren nur solche Lymphozyten, welche ihr Antigen erkennen und es werden somit nur antigenspezifisch reaktive T-Zellen angereichert.

Die polyklonale T-Zellkultur wurde angesetzt, indem die isolierten CD8 positiven T-Lymphozyten mit letal bestrahlten (100 Gray, Gy) allogenen DC des Hautspenders kokultiviert wurden. Dazu wurden pro Kultureinheit (KE) einer 24-Loch-Platte 1×10^6 Lymphozyten mit 1×10^5 bestrahlten DC in 2 ml AIM-V_{10%HS} zusammen gegeben. Bei teilweise HLA-identischen Spendern wurde am dritten Tag nach der primären Stimulation jeder KE 50 U/ml IL-2 zugesetzt. Am siebten Tag folgte die erste Restimulation mit bestrahlten DC und 14 Tage später eine weitere. Für die Restimulationen wurden 1×10^6 Lymphozyten erneut mit 1×10^5 bestrahlten DC in 2 ml AIM-V_{10%HS} unter direkter Zugabe der jeweiligen Zytokine kokultiviert. Bei sehr gutem Wachstum der Zellen wurden diese wenigen Tagen nach der Restimulation geteilt, wobei sie jeweils von einer auf zwei KE aufgeteilt wurden und jede KE mit frischem Medium ohne Zytokine aufgefüllt wurde. Ab Kulturtag 19 wurden die T-Zellen auf ihre Funktionalität in IFN- γ -ELISpot-Assays getestet. Dadurch konnte die gesteigerte Reaktivität, verglichen mit den unstimulierten T-Zellen, ermittelt werden. Mittels Blockade der HLA-Moleküle auf den Zielzellen durch monoklonale Antikörper konnten die HLA-Restriktionen der MLDC festgestellt werden.

2.2.6. Interferon- γ -ELISpot-Assay

Der INF- γ -ELISpot-Assay dient dem Nachweis T-Zellen die antigenabhängig IFN- γ sezernieren. Dazu wird ein monoklonaler Antikörper gegen humanes IFN- γ eingesetzt, welcher mit dem konstanten Teil seiner schweren Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran bindet. Mit seinem variablen Bereich bindet er IFN- γ , welches T-Lymphozyten nach Antigenerkennung freisetzen. Um gebundenes Zytokin mit einer Farbreaktion sichtbar zu machen, wird nach Abwaschen der Zellen ein Sekundärantikörper hinzu gegeben, welcher ein zum Primärantikörper differierendes IFN- γ -Epitop erkennt und an Biotin gekoppelt ist. Die Färbereaktion wird über die subsequente Zugabe von Streptavidin, Peroxidase und einem wasserlöslichen Peroxidasesubstrat ausgelöst und kennzeichnet die Orte der Zytokinfreisetzung auf der Membran.

Die ELISpot-Platte (96-Loch Mikrotiterplatte mit Boden aus Nitrozellulosemembran) wurde nach Vorbereitung durch 35% Ethanol mit dem anti-IFN- γ -Primärantikörper (60 μ l / Testeinheit (TE), 10 μ g / ml in PBS) beschichtet und am Vorabend des Testtages über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch serumhaltiges Medium (100 μ l / TE) abgesättigt. Die Zielzellen und Effektorzellen wurden in einem Volumen von 100 μ l AIM-V 10 % in die TE pipettiert. Dabei wurden die Zielzellen meist mit 2×10^4 Zellen / TE eingesetzt. Als Effektorzellen wurden T-Zellen mit 1×10^5 oder mehrfach stimulierte am fünften Tag nach Restimulation mit 5×10^3 Zellen / TE verwendet. Der Test konnte nach 20 Stunden Inkubation im Brutschrank entwickelt werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS / 0,05 % Tween20 von der Membran gewaschen (6 Mal). Nach diesen Waschschrritten wurde der biotinylierte Sekundärantikörper mit einem Volumen von 60 μ l / TE und einer Konzentration von 2 μ g / ml in PBS/0,5 % BSA in die TE pipettiert und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mit PBS/0,05 % Tween20 6 Mal gewaschen, bevor der Avidin-Peroxidase-Komplex zu 100 μ l / TE zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde.

Der Komplex wurde angesetzt, indem pro ELISpot-Platte 10 ml PBS / 0,1 % Tween20 mit einem Tropfen Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B aus dem Vectastain Elite Kit versetzt und 30 min inkubiert wurde. Es wurde erneut mit PBS /

0,05 % Tween20 gewaschen (dreimalig) und im Anschluss dreimal mit PBS, bevor durch Zugabe der Substratlösung AEC zu 100 µl / TE das Entwickeln gestartet wurde. Kurz vor Gebrauch wurde das benötigte Volumen an Substratlösung mit 0,5 µl Wasserstoffperoxid pro Milliliter AEC versetzt, wobei das Wasserstoffperoxid hier als Katalysator der Reaktion fungierte. Nach 5 bis 15 min konnte die Reaktion durch Spülen mit fließendem Leitungswasser abgestoppt werden. Nach vollständiger Trocknung der Nitrozellulosemembran erfolgte die automatisierte und standardisierte Zählung der entstandenen IFN- γ -Spots.

Klassische T-Zellen erkennen ihr Antigen nur in Verbindung mit den HLA-Molekülen, über die das Peptid präsentiert wird. Diese HLA-restringierte Reaktivität kann durch monoklonale HLA-spezifische Antikörper blockiert werden, welche die jeweiligen HLA-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen maskieren, so dass die T-Zelle ihr Antigen nicht mehr erkennen kann.

Nur wenige monoklonale Antikörper sind für Blockade-Experimente geeignet, da sie nicht nur das HLA-Allel bzw. eine HLA-Allelgruppe spezifisch erkennen müssen, sondern dieses auch so abschirmen müssen, dass die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes durch die T-Zelle nicht mehr möglich ist. Folgender HLA-spezifischer Blockade-Antikörper wurde verwendet: W6/32. Dieser Antikörper erkennt eine räumliche Struktur, die allen HLA-Klasse-I Proteinen gemein ist, die mit β 2m assoziieren. Darunter zählen alle klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C) und einige der nicht klassischen HLA-Klasse-Ib-Moleküle (HLA-E, -J und vermutlich auch HLA-G und -F). Alle klassisch HLA-restringierten CD8 positiven T-Zellen sollten durch diesen Antikörper blockiert werden. Die Konzentration von W6/32 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100 µg / ml.

GAP-A3 diente lediglich als Isotypenkontrolle. Er wurde mit einer Konzentration zwischen 50 und 100 µg / ml in den Tests eingesetzt.

2.2.7. Kryokonservierung von Zellen

Vorerst nicht mehr in Kultur benötigte oder zu expandierende Zellen wurden für die Langzeitaufbewahrung kryokonserviert. Dazu wurden diese gezählt, abzentrifugiert und in dem gewünschten Volumen Kryokonservierungsmedium, das zuvor mit 10 % DMSO versetzt wurde, aufgenommen. Die Zellen wurden auf die entsprechende Anzahl an Einfrier-Röhrchen (1ml Volumen pro Röhrchen) verteilt und diese in Kryokonservierungsboxen gestellt, die durch eine Ummantelung aus Isopropanol ein kontrolliertes Abkühlen von 1 °C pro Minute gewährleisten. Das Abkühlen erfolgte zunächst in einem -80 °C Gefrierschrank, bevor die Röhrchen zur Langzeitlagerung in die Stickstoffbank überführt wurden. Die pro Einfrier-Röhrchen einzufrierenden Zellzahlen betragen in der Regel für T- Zellen zwischen $0,4$ und 5×10^6 , für Suspensionszelllinien zwischen 6 und 12×10^6 Zellen pro Milliliter Einfriermedium. Maximal wurden 70×10^6 Zellen eingefroren.

2.2.8. PCR – Polymerase Kettenreaktion

Aus Milz oder peripherem Blut wurden Zellen isoliert und mit dem NucleoSpin Tissue Kit genomische DNS (Desoxyribonukleinsäure) gewonnen. Die Anwendung erfolgte nach Protokoll des Herstellers für Gewebeproben. Eine Messung der gewonnenen DNS-Menge erfolgte mit dem Nanodrop 2000c. Von der gewonnenen DNS wurden pro PCR-Reaktion 20ng, 5U Hotstart Taq, 100pm Primer und 0,2mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) eingesetzt. Die Amplifikation des gewünschten Abschnitts erfolgte bei 56°C im FlexCycler (Biozym) durch 30 Zyklen. Es wurde ein 850-bp Fragment der alpha-satelliten Region des humanen Chromosom 17 amplifiziert, wobei die bekannten Primer 17a1 and 17a2 nach [110] verwendet wurden. Als Kontrolle diente murines β -Aktin.

Forward-Primer: TCCTGTGGCATCCACGAAACT;

Reverse-Primer: GAAGCATTTGCGGTGGACGAT.

2.2.9. Immunhistochemie - IHC

Für Immunhistologische Untersuchungen musste das Gewebe nach der Entnahme für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung fixiert werden. So soll der augenblickliche Zustand und die Struktur der Gewebe fixiert werden. Die komplexe Struktur der Proteine (Sekundär- und Tertiärstruktur), die eng mit ihrer biologischen Aktivität verbunden ist, wird durch eine Vielzahl chemischer Bindungen zwischen den Untereinheiten eines Proteinmoleküls aufrechterhalten. Formaldehyd führt zur Vernetzung der Proteine. So werden die biologischen Aktivitäten der Proteine möglichst erhalten. Dieser Umstand ist die Voraussetzung für den Nachweis antigener Eigenschaften.

Um nun die Gewebe in Paraffin zu überführen, wurden sie zur Einbettung zwischen Gewebeeinbettungsschwämme gelegt und in einer Einbettkassette verschlossen. Die Schwämme sorgen dafür, dass die Haut flach aufgespannt wird und verhindern bei kleineren Proben deren Verlust. Die Entwässerung erfolgte in einem Vakuum Gewebe-Infiltrationsautomat, welcher die wässrige Formaldehydlösung erst durch Alkohol und anschließend durch das Lösungsmittel Xylol ersetzt. Zuletzt wird das xylollösliche Paraffin zugesetzt. Die Proben können im Anschluss an diese Prozedur in Metallförmchen ausgebettet werden. So fixiert sind die Proben dauerhaft über Jahrzehnte haltbar.

Das Schneiden der Blöcke erfolgte mit gekühlten (4°C) Blöckchen und einem Rotationsmikrotom. Schnitte wurden im Bereich von 3-5 mm angefertigt, in einem Kaltwasserbecken aufgefangen und auf einen Objektträger aufgezogen. Falten wurden durch Strecken in warmem Wasser entfernt (48°C). Das unter dem Schnitt haftende Wasser wurde durch Lagerung auf einem Objektträger-Strecktisch (45°C) entfernt. Um das Gewebe auf dem Objektträger zu fixieren, wurden die fertig aufgezogenen Schnitte im Brutschrank bei einer Temperatur von 80°C für 60 min zum Anschmelzen und endgültigen Trocknen gebracht.

Die Schnitte wurden anschließend bis zur Verwendung bei RT gelagert.

2.2.9.1. Vorbereiten der Schnitte für die Färbungen

Um das Gewebe färben zu können, musste es entparaffiniert und rehydriert werden. Die Entparaffinierung erfolgte durch ein Bad in Xylol (2-5 min). Anschließend folgte die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (Bad von jeweils 5 min) in 100% Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol und Aqua dest.

2.2.9.2. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau (z.B. Zellkerne, Ribosomen und das endoplasmatische Retikulum). Eosin färbt alle eosinophilen Strukturen rot (z.B. Zellplasmaproteine). Zur Färbung der Paraffinschnitte wurden die Objektträger wie beschreiben vorbereitet und für 8 min in Meyers Hämalaun gebadet. Anschließend wurden sie 10 min unter laufendem Leitungswasser „gebläut“. Zur Färbung der eosinophilen Strukturen wurden die gebläuten Schnitte für 40 Sek in Eosin getaucht. Nach kurzem Abspülen mit Leitungswasser wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 96%-, 96% Ethanol, zwei Mal Isopropanol) entwässert und zum Klären zwei Mal in Xylol getaucht. Das Eindecken erfolgte mit dem xylollöslichen Entellan.

2.2.10. Prinzip des Dako Real™ EnVision™ / HRP, Detektionssystems

Zellgebundenes Antigen wurde mit dem Dako Real™ EnVision™ / HRP Detektionssystem gefärbt. Hierbei wird ein primärer Antikörper gegen humanes Antigen (aus Maus oder Kaninchen) mit dem Gewebeschnitt inkubiert. Zur Detektion wird ein sekundärer Antikörper verwendet, der gegen den speziesspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Viele dieser Antikörper sind an ein Dextranpolymer gebunden an welche zusätzlich zahlreiche HRP Moleküle (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt sind. Die Farbreaktion wird mit Hilfe eines Chromogens durchgeführt. Man verwendet ein Substratsystem, welches aus zwei Komponenten besteht: dem DAB+ Chromogen, einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung) und einem peroxidhaltigen Substratpuffer. Die am Dextranpolymer gebundenen Horseradishperoxidase (HRP) Moleküle katalysieren hierbei eine Oxidation des Elektronendonators DAB zu einem braunen, wasserunlöslichen Farbstoff. Somit kann indirekt das vom Primärantikörper erkannte Antigen sichtbar gemacht werden (Abb.4). Da viele HRP Moleküle gebunden sind, ist diese Methode sehr sensitiv und kann auch bei geringer Antikörperkonzentration angewendet werden.

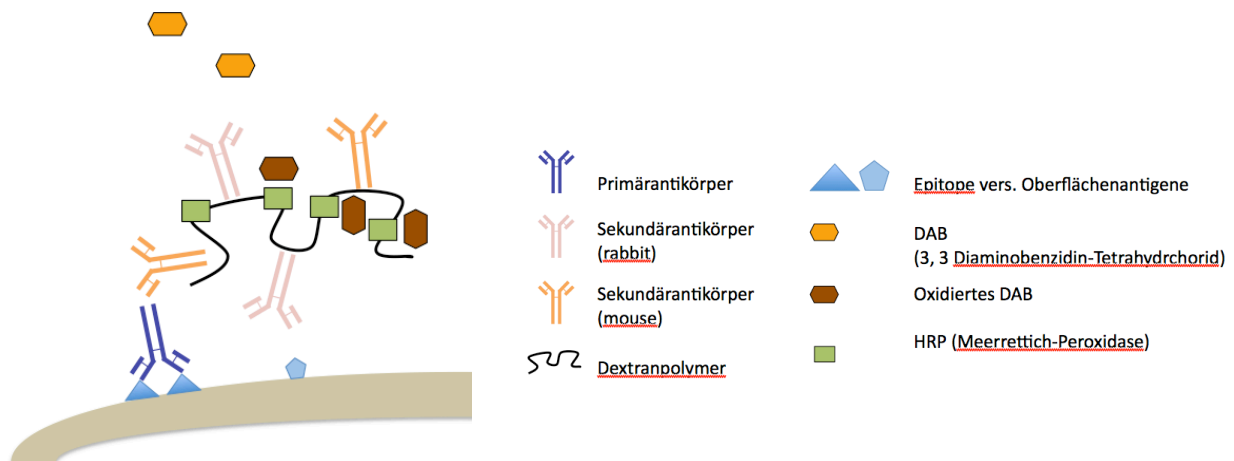


Abbildung 4) Prinzip des Dako Real Envision HRP Systems. Primärantikörper binden ihr spezifisches Oberflächenmolekül. Sekundärantikörper des Kits, gebunden an ein HRP haltiges Dextranpolymer, erkennen den Fc-Teil des Primärantikörpers und binden an diesen. Das Substrat DAB wird von den HRP Molekülen oxidiert und so eine Farbreaktion ausgelöst.

2.2.11. Prinzip des Dako REAL™ Alkaline Phosphatase / RED, Detektionssystems

Dieses System nennt sich Labeled-Streptavidin-Biotin Methode (LSAB) und enthält biotinylierte Sekundärantikörper. Die Biotinylierung sorgt zusätzlich noch für eine erhöhte Detektionsempfindlichkeit.

Das Substratsystem besteht aus vier Komponenten: Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und dem AP Substratpuffer. Zu der Substrat-Chromogenlösung wird konzentriertes Levamisol hinzugegeben, um eine Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase zu gewährleisten. Das Substratchromogen führt zu einem roten Endprodukt am Ort des Zielantigens (Abb.5).

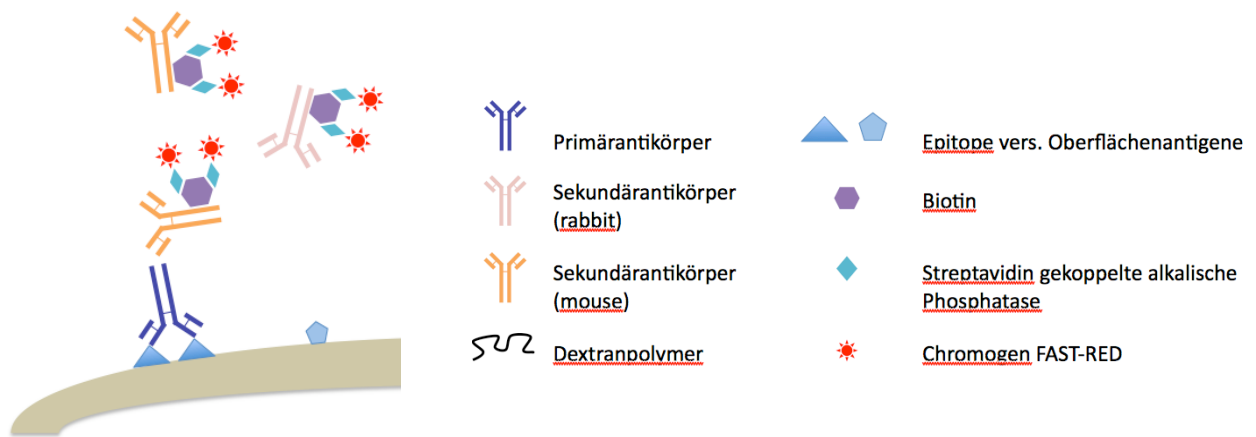


Abbildung 5) Das Prinzip des Dako Real Alkaline Phosphatase Systems. Primärantikörper binden ihr spezifisches Oberflächenmolekül. Sekundärantikörper des Kits, gebunden an Biotin und alkalische Phosphatase, binden an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Die Farbreaktion erfolgt durch die alkalische Phosphatase, welche die Chromogene phosphoryliert.

2.2.12. Die immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung ist eine Methode, welche es ermöglicht, fixierte Proteine (Antigene) mit Hilfe von Antikörpern zu färben und so entsprechend positive Zellen sichtbar zu machen.

Zur Färbung des Paraffinschnitts wurde dieser wie beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Obwohl formalinfixierte und in Paraffin gebettete Gewebeproben die morphologischen Strukturen der Epitope in einer hohen Qualität gewährleisten, ist es möglich, dass die Struktur der Antigene verändert oder maskiert wurde und es in der

Folge zum Verlust der Immunreaktivität mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper kommen kann. Diese kann jedoch durch Hitzebehandlung, sog. HIER (engl.: *heat induced epitope retrieval*), oder proteolytische Behandlung, sog. PIER (engl.: *proteolytic induced epitope retrieval*) „gerettet“ werden. In dieser Arbeit wurde die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit einer Demaskierungslösung (von Hersteller des entsprechenden Antikörpers angegeben: Citrat- oder EDTA-Puffer) durchgeführt. Je nach Antikörper wurden die Schnitte im Dampfgerät mit passendem Puffer 40 min gekocht. Danach wurden sie für 20 min bei RT abgekühlt.

Nach der Vorbereitung konnte mit der Färbeprozedur begonnen werden. Da bei der Färbung ein Enzym verwendet wird, welches Peroxidase umsetzt, kann es zu unspezifischen Färbungen kommen, wenn die endogene Peroxidase noch aktiv ist. Aus diesem Grund wurde nach der Demaskierung die endogene Peroxidaseaktivität blockiert (5 min Inkubation der Peroxidase Blocking Solution). Diese Lösung wurde mit Aqua dest. abgespült und in frischem Aqua dest. für 5 min inkubiert. Abschließend wurde zweimal mit TRIS-Puffer gewaschen (5 min).

Pro Schnitt wurden 100 µl des verdünnten primären Antikörpers auf den Schnitt getropft und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit TRIS Puffer (5 min), wurde anschließend der sekundäre Antikörper des Kits aufgetropft und nach 30 min abgespült (zwei mal 5 min TRIS Puffer).

Der benötigte Farbkomplex wurde durch Mischung von Dako DAB+ Chromogen und Dako Substratpuffer laut Anleitung des Herstellers angesetzt, aufgetropft und für 5 min inkubiert. Das Abspülen erfolgte mit Leitungswasser und Aqua dest.

Zur Gegenfärbung der Kerne diente Mayers Hämalaun (1 min) mit anschließendem „Bläuen“ unter laufendem Leitungswasser. Die gefärbten Schnitte wurden kurz getrocknet und erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (zwei Mal Isopropanol, zwei Mal Xylol für je 2 min). Der fertige Objektträger wurde mit Entellan eingedeckt.

2.2.13. Hautgewinnung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Hauttransplantationen wurde gesunde, menschliche Haut von Erwachsenen Spendern benötigt. Die Verwendung von Haut und Blut wurde durch die Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz genehmigt [837.227.05(4885)].

Haut fiel als Überschuss bei orthopädischen, chirurgischen, gynäkologischen oder schönheitsoptimierenden Eingriffen an. Zur Verwendung lag eine Einwilligung des jeweiligen Patienten vor. Die Haut wurde in NaCl-Lsg aufbewahrt in Hautmedium überführt und maximal 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Mit Hilfe von Schere und Skalpell wurde unter sterilen Bedingungen das Unterhautfettgewebe und Bindegewebe der Haut entfernt. Es wurden runde (15 mm Durchmesser, 2-3 mm Tiefe) Stücke aus dieser vorbereiteten Haut geschnitten und in frischen Hautmedium bis zur Transplantation aufbewahrt.

2.2.14. Transplantation

Die Transplantation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Tiere mit der Narkosemischung (10 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 62,5 mg/kg Körpergewicht Ketamin) analgesediert. Es wurden 5-16 Wochen alte Männchen und Weibchen verwendet.

Zum Schutz der Augen während der Narkosezeit wurden die Augen mit Augen- und Nasensalbe (Bepanthen) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurden die narkotisierten Mäuse interskapulär rasiert und desinfiziert. Die murine Haut wurde entsprechend der Transplantatgröße entfernt, das Transplantat eingepasst (Abb.6, A) und an vier Seiten mit Nahtmaterial fixiert (B). Die verbliebenen Wundränder wurden mit Fibrinkleber (Tissucol, Baxter) verschlossen. Zum Schutz wurde das Transplantat mit paraffinierter Baumwollgaze bedeckt und durch Nähen eines Haut-*Pouches* geschützt (C).

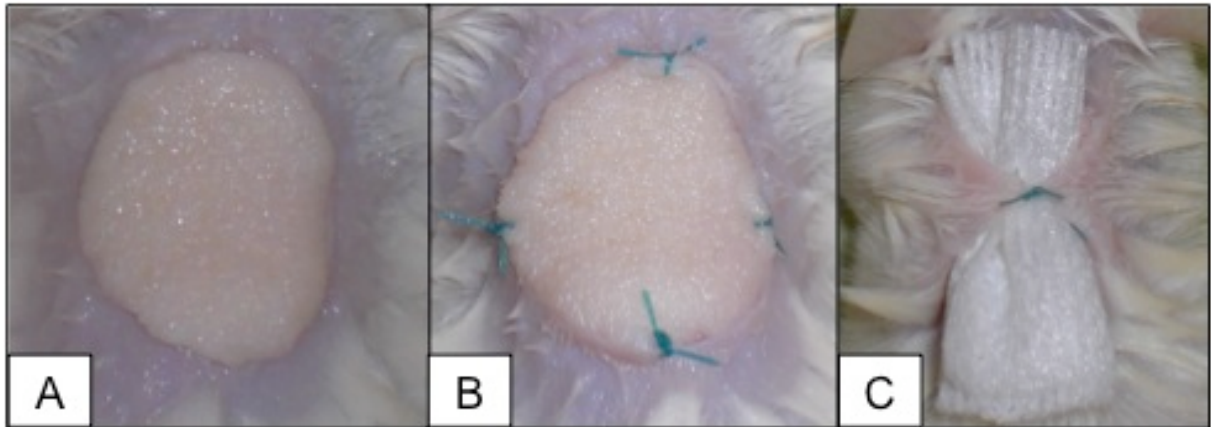


Abbildung 6) Prozess der Transplantation. **A** Eingepasstes Tranplantat **B** Mit vier Stichen fixiertes Transplatat **C** Pouch zum Schutz des Transplantats.

Nach der Transplantation wurden die Tiere separiert und bis zum Ende der Narkose beobachtet und mit Hilfe einer Rotlichtlampe warm gehalten. Nach 3-4 Wochen des Einheilens, wurden die Mäuse wieder in Gruppen von bis zu drei Tieren zusammengesetzt. Einmal pro Woche wurde das Transplantat mit Augen- und Nasensalbe eingecremt.

2.2.15. Biopsieentnahme

Die Biopsieentnahme wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und erfolgte unter Narkose wie unter 2.2.14. beschrieben. Die Stelle, an der sich das Transplantat befand, wurde mit dem Rasierer von umliegendem Mausfell befreit. Ein Teil des Transplantats wurde mit einer Schere entnommen und in 4,5% Formaldehydlösung konserviert.

Die Wundstelle wurde vernäht und mit Augen- und Nasensalbe eingecremt. Nach erfolgter Biopsie wurden auch hier alle Tiere bis zum Erwachen beobachtet und mit Hilfe einer Rotlichtlampe warm gehalten.

2.2.16. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte nach vorangegangener zervikaler Dislokation. Die Milz wurde nach dem Auftrennen des Fells und der Bauchdecke entnommen und durch Verreiben des Organs auf einem Zellsieb (70 µm Porengröße) eine Einzelzellsuspension erstellt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet resuspendiert und in 1 ml Präp-Medium bis zum weiteren Gebrauch auf Eis aufbewahrt.

2.2.17. Epidermis Präparation

Unterhautfett- und Bindegewebe wurde von der Hautprobe entfernt, die Probe in 5 mm² große Stücke zerteilt und diese anschließend in eine Petrischale überführt. Danach wurden die zerkleinerten Hautproben in Dispase-Medium gegeben und für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Epidermis mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette von der Dermis abgezogen und in eine Petrischale mit 3 ml PBS überführt. Die Epidermis breitet sich auf der PBS-Oberfläche aus und ware so vom Dermisgewebe zu unterscheiden.

2.2.17.1. Fluoreszenzfärbung der Epidermis

Zur Detektion der LC wurde ein CD1a Antikörper verwendet, welcher auch für die durchflusszytometrische Untersuchung verwendet wird. Dieser diente als Primärantikörper. Als Sekundärantikörper wurde ein goat-anti-mouse Antikörper, gekoppelt an Alexa Fluor 488 verwendet. Dieser wurde zur Verstärkung der Fluoreszenz genutzt. Eingedeckt wurde das fertige Epidermalsheet in Vectashield mounting medium. Dieses verhindert das frühzeitige Ausbleichen der Probe.

Die Färbung wurde in einer 96-Loch Platte durchgeführt. Die Epidermis wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mittels eiskaltem Aceton (-20°C) für 15 min auf Eis fixiert. Die fixierte Epidermis wurde in ein Loch der Platte überführt und für fünf min in TBS inkubiert. Das TBS wurde abgenommen und durch neues TBS (150 µl) ersetzt indem das Epidermisstück wieder fünf min gewaschen wurde. Dieser Vorgang wiederholte sich insgesamt drei Mal, bevor die Haut 30 min in 150 µl Blocking-Puffer überführt wurde. Der Blocking-Puffer wurde durch 50 µl einer 1:100 in FACS-Puffer verdünnten CD1a-FITC Antikörper-Lösung substituiert und mit der Epidermis über die Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurde mit 150 µl TBS gewaschen und dreimalig für 5 min inkubiert. Nach einer Inkubation über 30 min in 150 µl Blocking-Puffer bei RT, wurde dieser durch 50 µl des goat-anti-mouse Antikörpers in einer Verdünnung von 1:200 ausgetauscht und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurde mit 150 µl TBS gewaschen und dreimalig für 5 min inkubiert. Der letzte Waschschrift erfolge mit PBS. Die gewaschene Epidermis wurde nun in eine Petrischale mit PBS überführt und mit Hilfe einer Pinzette oder einer Pipettenspitze auf einen im PBS eingetauchten Objektträger aufgezogen. Das überschüssige PBS wurde entfernt und das Epidermisstück mit *Vectashield mounting medium* auf dem Objektträger eingedeckt.

2.2.17.2. Durchflusszytometrie

Verschiedene Zellpopulationen können anhand der selektiven Expression bestimmter Oberflächenmoleküle in FACS (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*) Färbungen charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression unterschiedlicher CD-Antigene überprüft. Diese Oberflächenstrukturen sind in unterschiedlichem Maße und unterschiedlicher Zusammensetzung auf verschiedenen Zelltypen exprimiert [111]. In dieser Arbeit wurden Lymphozyten sowie Einzelzellsuspensionen muriner Organe durch diese phänotypischen Untersuchungen charakterisiert, indem spezifische monoklonale Antikörper für bestimmte Oberflächenmoleküle und HLA-Allele eingesetzt wurden. Diese Maus- oder Rattenantikörper (IgG) waren gegen die jeweiligen humanen Moleküle gerichtet und direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE oder APC) gekoppelt.

Durch Verwendung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe war die Untersuchung von bis zu drei Oberflächenmolekülen in einem Ansatz gewährleistet. Im Durchflusszytometer wurden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt, emittierten Licht eines entsprechenden Spektrums und konnten so detektiert werden. Zellen konnten so identifiziert und quantitativ ausgezählt werden. Üblicherweise wurden 1×10^4 vitale Zellen pro Versuchsansatz im Durchflusszytometer gemessen.

Die benötigte Menge der zu untersuchenden Zellen (1×10^5 bis 2×10^5 pro Versuchsansatz) wurde abzentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und auf die entsprechende Anzahl an FACS-Röhrchen verteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen resuspendiert und für die direkte Färbung $2,5 \mu\text{l}$ eines direkt an den Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Antikörpers zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, und schließlich mit $500 \mu\text{l}$ 1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert.

3. ERGEBNISSE

In Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern, erhielten wir nach chirurgischen Eingriffen Resthautpräparate. Insgesamt wurde Haut von 27 Patienten verwendet. Von 16 Patienten konnte auch Blut gewonnen werden. Die PBMC wurden nach Ficoll-Isolation kryokonserviert oder direkt zur Generierung von DC verwendet wurden. Auch T Lymphozyten zur Durchführung einer MLDC wurden aus diesem Blut gewonnen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem zu entwickeln, mit dem es möglich sein sollte, epidermale LC und deren Rolle bei der Entstehung von Haut-GvHD zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde humane Haut auf NSG-Mäuse transplantiert. Eine Zusammenfassung aller Patienten und der Menge der Transplantationen ist in Tab.1 aufgeführt. Für die Hauttransplantation wurden verschiedene Methoden etabliert. Diese sind in Abschnitt 3.2., Tab. 7 aufgeführt.

Zur Induktion einer GvHD-artigen Alloimmunreaktion in den Hauttransplantaten wurden CD8 T-Lymphozyten von HLA-partiell *gematchten* Spendern (hier: Buffycoat Spender) verwendet. CD8 positive T-Zellen sind maßgeblich an einer Entzündungsreaktion beteiligt. Diese wurden *in vitro* gegen DC vom Hautspender stimuliert. Dies sollte die Proliferation von reaktiven CTL fördern, welche im Anschluss das Transplantat als fremd erkennen und attackieren sollten. Insgesamt wurden 11 Versuche mit insgesamt 121 transplantierten Tieren und T-Zellgabe durchgeführt (Tab.6, farbig und grau unterlegt).

Patient	Anzahl Transplantate	Erfolgreich angewachsen	System
1	5	0	
2	6	6	S108
3	8	0	
4	5	5	
5	5	4	
6	6	0	
7	4	0	
8	10	8	S208
9	10	8	
10	12	10	S308
11	15	12	S209
12	9	6	S109
13	15	15	MZAC1
14	15	10	
15	14	13	S309
16	10	10	
17	5	3	
18	10	3	
19	20	18	S110 S210
20	20	17	S310 S410 S510
21	15	11	
22	12	10	
23	22	22	F410
24	10	10	F510
25	10	10	G410
26	10	10	G510
27	17	15	G610

Tabelle 6) Übersicht der durchgeführten Experimente. Patientennummer mit Anzahl an durchgeführten Transplantationen, erfolgreichem Anwachsen und Versuchsnummer.

Im Folgenden wurden 8 Versuche exemplarisch herausgegriffen, welche sich mit der Auswirkung von T-Zellen auf DC Populationen im Transplantat beschäftigen (Tab.6, Blau). Besonderes Augenmerk wird dabei auf LC gelegt. Des Weiteren wird ein exemplarischer Versuch gezeigt, welcher sich ausschließlich mit im Transplantat enthaltenen APC beschäftigt und deren Verteilung im Laufe des Heilungsprozesses beleuchtet (Tab.6, Hellblau). Zur Depletion von LC mittels UV-Strahlung wurden insgesamt 4 Systeme getestet, wobei 3 im Folgenden exemplarisch dargestellt werden (Tab.6, Dunkelblau).

3.1. HAUTTRANSPLANTATION

In den durchgeführten Experimenten wurde humane Haut, wie beschrieben, auf NSG-Mäuse transplantiert. Abbildung 7 (A) und (B) zeigen das Transplantat am Tag der Transplantation. Während der ersten Wochen der Heilung kam es zu einer Schrumpfung und es bildete sich eine Kruste (C), welche die Untersuchung erschwerte. In der sechsten Woche waren die Wundränder des Transplantats gänzlich verheilt (D) und eine Vaskularisierung war deutlich erkennbar (E).

Insgesamt wurden für diese Arbeit 383 Tiere transplantiert und es konnte insgesamt eine durchschnittliche *engraftment*-Rate von ca. 78% erreicht werden.

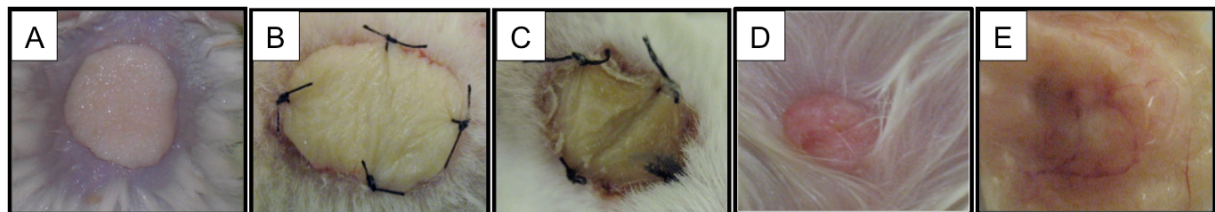


Abbildung 7) Verlauf der Einheilung des humanen Hauttransplantats, **A** Einpassung des Transplantats, **B** Fixierung des Transplantats, **C** geschrumpftes Transplantat nach einer Woche, **D** eingeeheiltes Transplantat, **E** Vaskularisierung (Rückseite).

3.1.1. Hautqualität

Die Hauttransplantate wurden aus Resthaut unterschiedlicher Herkunft gewonnen. In ersten Versuchen erhielten wir Haut von exzidierten Narben und amputierten Gliedmaßen. Abhängig von der Erkrankung, einem Vorliegen von Infektion oder Gefäßerkrankungen waren die Resultate bei der Xenotransplantation variabel. Nicht zur Transplantation geeignet waren Narbenexzidate. In der Folge konnte gesunde Haut aus Reduktionsplastiken und Bauchdecken verwendet werden.

3.2. METHODEN DER TRANSPLANTATION

Für diese Arbeit wurde die Methode der Hauttransplantation etabliert und bekannte Methoden optimiert.

Nach Boehncke *et. al.* [112]: Die Haut wurde von Unterhautfettgewebe befreit und mit 8 Stichen fixiert. Die Abdeckung der Wunde erfolgt durch Paraffingaze, welche an vier Stellen mit der murinen Haut vernäht wurde. Die humane Haut wurde anschließend alle zwei Tage mit Wund- und Heilsalbe eingecremt.

Das Risiko des Verlustes der Transplantate war, durch die Aktivität der Tiere, relativ groß. Nach Erwachen aus der Narkose begannen diese direkt damit, die schützende Gaze zu entfernen und das Transplantat zu gefährden. Mit dieser Methode wurden insgesamt 41 Transplantate fixiert. Es wuchsen 18 Transplantate an, was einem *Engraftment* von 44% entspricht (Tab. 7).

Eine Möglichkeit der alternativen Fixierung des Transplantats war Fibrinkleber (Tissucol® Gewebekleber), welcher die Wundränder des Transplantats verschloss. Dabei werden zwei Komponenten vermischt, welche u.a. Thrombin und Fibrinogen enthalten. Das Fibrinogen wird vom Thrombin in Fibrin gespalten und dieses aktiviert Faktor XIII zu Faktor XIIIa. Faktor XIIIa führt zu einer Quervernetzung des Fibrins, dadurch entsteht ein stabiles, reißfestes, aber gleichzeitig auch elastisches Fibrinnetz. Der Gewebekleber gewährleistet eine Nahtsicherung problematischer Nähte, unterstützt die Blutstillung und beschleunigt die Wundheilung. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass das Fibrinnetz auch von körpereigenen Enzymen lysiert werden kann. Ein „Fädenziehen“ nach der Wundheilung ist deshalb überflüssig. Mit dieser Methode wurden insgesamt 71 Transplantate fixiert. Davon konnten 52 Transplantate *engraften*, was einer Rate von 82% entspricht (Tab.7).

Eine Kombination der beiden beschriebenen Methoden führte zu den besten Ergebnissen im Bezug auf das Anwachsen der Transplantate. Durch Fixierung der menschlichen Haut mit vier Stichen und dem zusätzlichen Verschluss der Wundränder mit Fibrinkleber, konnte der Verlust der Transplantate durch die Aktivität der Tiere stark reduziert werden. Insgesamt wurden 226 Tiere auf diese Weise transplantiert und es ergab sich ein *Engraftment* von 95% bei 214 verbliebenen Transplantaten (Tab.7).

Alternativ zum Gewebekleber wurde Sprühpflaster verwendet. Dieses ist atmungsaktiv, wasserfest und transparent. Es besteht im Wesentlichen aus einem filmbildenden Polymer auf Acrylatbasis, gelöst in einem Lösemittelgemisch (Ethylacetat). Zusätzlich enthält die Dose Treibmittel (n-Pentan, CO₂) und einen Zusatzstoff (Menthol), welcher als Geruchs- und Wirkstoff mit leicht desinfizierender Wirkung dient. Die Tiere mögen den Geschmack nicht und sehen davon ab, die Wunde durch beißen zu öffnen. Mit dieser Methode wurden insgesamt 45 Tiere Transplantiert und ein *Engraftment* von 93% erreicht (Tab.7).

In Tabelle 7 sind alle Methoden und die Anzahl der Transplantierten Tiere mit *Engraftment*-Rate in Prozent zusammengefasst.

Methode	Anzahl	Verbleib	Prozent
Faden	41	18	44%
Kleber	71	58	82%
Faden und Kleber	226	214	95%
Faden und Sprühpflaster	45	42	93%

Tabelle 7) Methoden der durchgeführten Experimente, Anzahl und Verblieben Tiere mit deren Engraftmentrate in Prozent

3.2.1. Histologie der Transplantierten Haut

Die Transplantate verkleinerten sich während des Heilungsprozesses im Durchmesser und bildeten eine Kruste, welche sich nach 3 bis 5 Wochen ablöste. Histologisch war eine Hyperparakeratose festzustellen, was eine Kombination aus verstärkter (Hyperkeratose) und gestörter Verhornung (Parakeratose) des *stratum corneum* ist. Ebenso entwickelte sich Akantose, welche sich durch ein verdicktes *stratum spinosum* auszeichnet.

3.3. ZELLPOPULATIONEN IM VERLAUF DES HEILUNGSPROZESSES

Zur Untersuchung der in der Haut befindlichen Zellpopulationen vor Transplantation wurde Haut für die immunhistologische Untersuchungen fixiert und eine H&E-Färbung wurde durchgeführt. Somit kann eine Übersicht des Gewebes angefertigt werden und etwaige Veränderungen sichtbar gemacht werden. Zur Detektion von LC wurde CD1a und CD207 in der Epidermis angefärbt (Abb.8, B und C). CD1a ist ein transmembranes Glycoprotein, welches dem MHC ähnelt und mit β -2-microglobulin heterodimerisiert. Dieses Protein ist auf der Membran von LC zu finden. CD207 bzw. Langerin ist in den Birbeckgranula der LC lokalisiert und gehört zu den C-Typ Lecitinen.

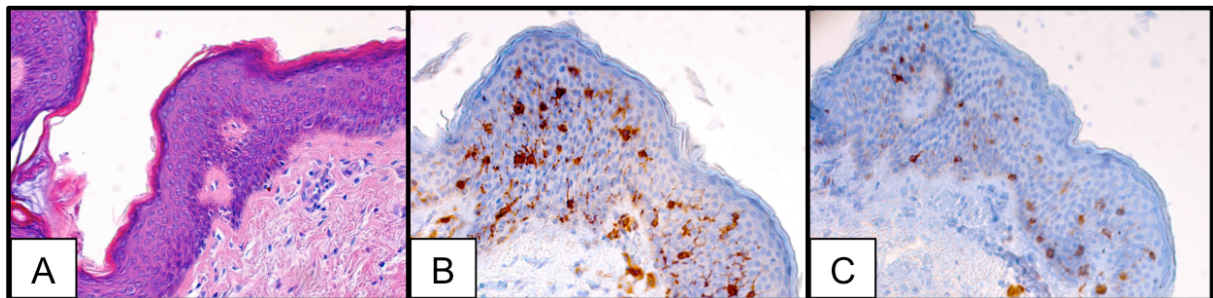


Abbildung 8) Darstellung der in der Haut befindlichen Langerhanszellen. Das Vorhandensein von LC in der transplantierten Haut wird überprüft. **A** H&E Färbung, **B** Färbung von CD1a, **C** Färbung von CD207/Langerin. Vergrößerung 200x

Weitere Oberflächenmarker unterschiedlicher Populationen der Haut wurden angefärbt, um einen Überblick über die Verteilung dieser zu erhalten. Dabei konnten CD3 positive T-Lymphozyten in Dermis und Epidermis (Abb.9, (A)), HLA-DR (B) und CD11c (C) positive Zellen in der Dermis, CD14 positive Makrophagen (D) und CD68 positive Monozyten (D) nachgewiesen werden.

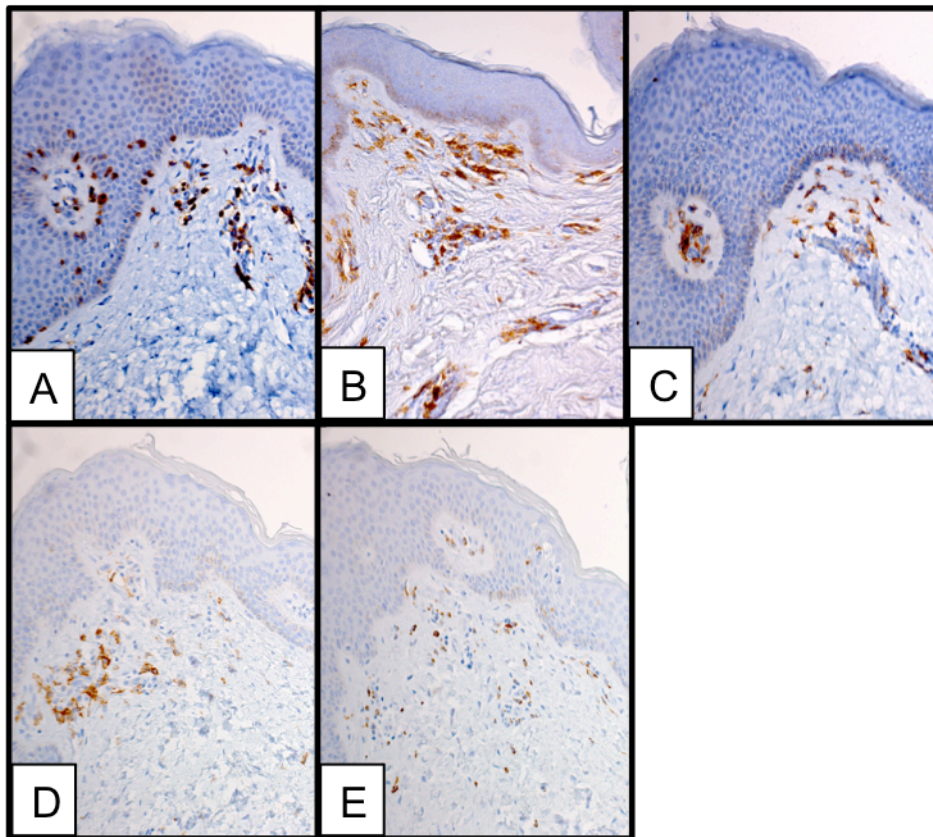


Abbildung 9) Färbung dermalen Zellpopulationen. **A** T-Lymphozyten mittels CD3, **B** HLA-DR positive Zellen, **C** CD11c positive DDC, **D** CD14 positive Monozyten und **E** CD68 positive Makrophagen. Vergrößerung 200x

3.3.1. MZAZ1

Die transplantierten Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet (Woche 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14; n=15). Bei den dargestellten Transplantaten handelt es sich um unterschiedliche Tiere einer Kohorte.

In der zweiten Woche nach Einheilung konnten LC in der humanen Epidermis durch die Marker CD1a und CD207 nachgewiesen werden (Abb.10, B und C). Allerdings war noch eine Kruste vorhanden, welche die Analyse erschwerte (Pfeil A). Einige CD3 positive Lymphozyten (D), HLA-DR positive APC (E), CD11c positive DDC (F) sowie CD14 positive Monozyten (G) waren dermal detektierbar.

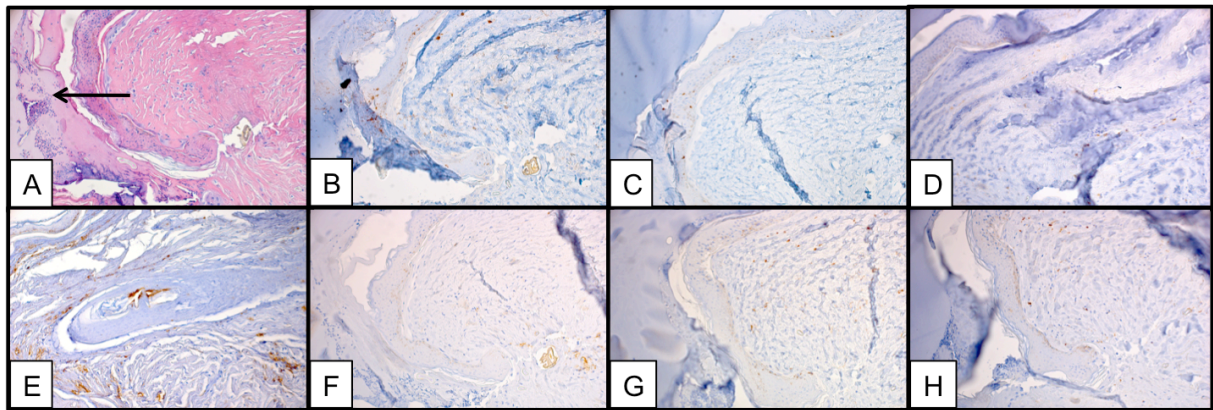


Abbildung 10) Analyse eines Transplantats zwei Wochen nach Transplantation. Alle untersuchten Populationen waren in ihrer Anzahl reduziert, verglichen mit dem Ausgangsbefund. **A** H&E Färbung, Pfeil: Krustenbildung, **B** LC, CD1a Färbung, **C** LC CD207 Färbung, **D** CD3 positive T-Lymphozyten, **E** HLA-DR, **F** CD11c positive DDC, **G** CD14. Vergrößerung 200x

In der vierten Woche nach Transplantation waren keine CD1a und CD207 positiven Zellen mehr in der Epidermis vorhanden (Abb.11, A und B). Auch HLA-DR war in der Epidermis nicht mehr nachweisbar (C). Ebenfalls reduzierte sich die Menge der CD11c und CD14 positiven Zellen (ohne Abbildung).

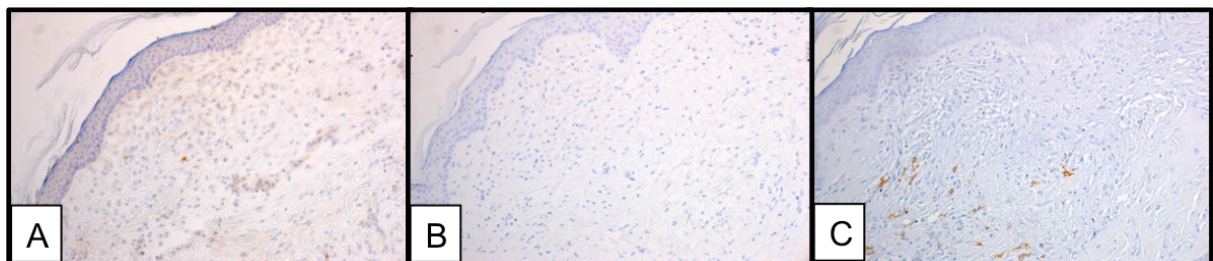


Abbildung 11) Transplantat vier Wochen nach Transplantation. Es waren keine LC nachweisbar. Die Färbung wurde mit drei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. **A** CD1a **B** CD207 **C** HLA-DR. Vergrößerung 200x

Histologisch zeigten sich in der 6. Woche nach Transplantation eine Hyperparakeratose (Pfeil spitz), Akanthose (Pfeil Raute) und pyknotische apoptotische Zellkerne in der Epidermis (Abb.12, A Pfeil rund). LC waren zu diesem Zeitpunkt nachweisbar, mittels CD1a und CD207 Färbung (B, C). CD14 positive Monozyten waren nicht nachweisbar (G), es befanden sich jedoch CD3 positive T Lymphozyten (E) und CD11c positive DDC (F) in der Dermis. HLA-DR positive Zellen waren sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis vorhanden (D).

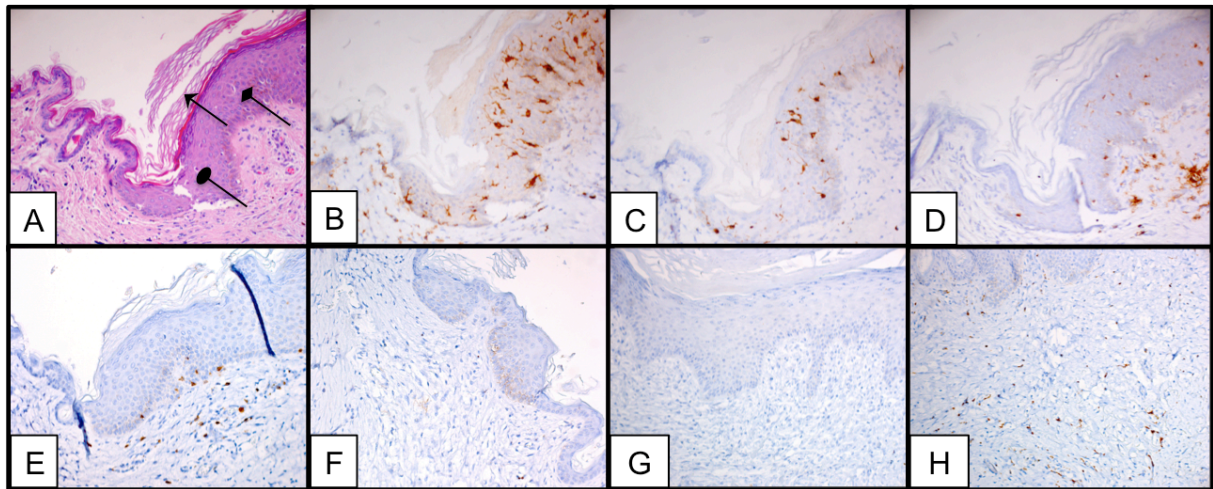


Abbildung 12) Übersicht verschiedener Zellpopulationen nach Transplantation in Woche 6. **A** H&E Färbung mit Hinweisen auf Hypoparakeratose (Pfeil spitz), Akanthose (Pfeil Raute), pyknotische Apoptosen (Pfeil rund) **B** CD1a Färbung der LC, **C** CD207 Färbung der LC, **D** HLA-DR Färbung mit epidermalen LC und dermalen APC, **E** CD3 positive Lymphozyten, **F** CD11c positive DDC, **G** CD14 positive Monozyten. Vergrößerung 200x

Da LC die Fähigkeit besitzen auszuwandern und zu den SLO zu migrieren, wurde die Milz der Tiere entnommen und wie beschrieben eine Einzellzellsuspension hergestellt. Aus dieser wurde DNA gewonnen und mittels PCR und spezifischen *Primern* für das humane Chromosom 17 untersucht (Abb.13)

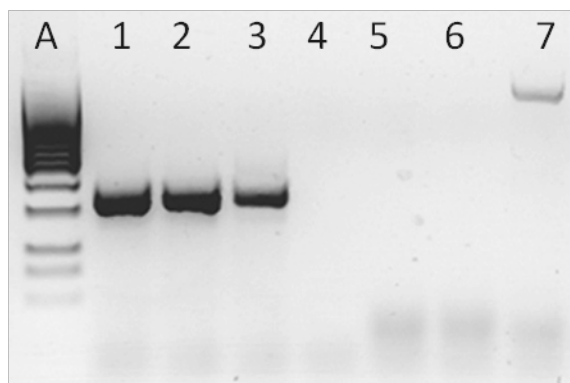


Abbildung 13) PCR der murinen Milzzellen. Verwendet wurden Primer spezifisch für murines β -Actin, getestet wurden Milz (1&2), Positivkontrolle (3), Wasser (4). Für das humane Chromosom 17, Milz (5&6), Positivkontrolle (7).

Dabei konnte murine DNA amplifiziert werden, jedoch keine humane DNA.

CD1a bzw. CD207/Langerin positive LC waren zwischen Woche 2 und 4 in der Haut nicht detektierbar. Sechs Wochen nach der Transplantation konnten LC jedoch wieder nachgewiesen werden (Vgl. Abb.12, B C D). Während des Versuchsverlaufs nahm die Anzahl der CD11c positiven DDC bis Woche 4 deutlich ab und stieg danach wieder an. CD11c positive und HLA-DR positive Zellen der Dermis blieben über die gesamte Dauer hinweg nachweisbar.

Eine semiquantitative Analyse wurde für CD1a und CD11c positive Zellen durchgeführt (Abb. 14). Diese verdeutlicht die Aussage über das Verschwinden der epidermalen LC und das konstante Vorkommen von CD11c positiven DDC.

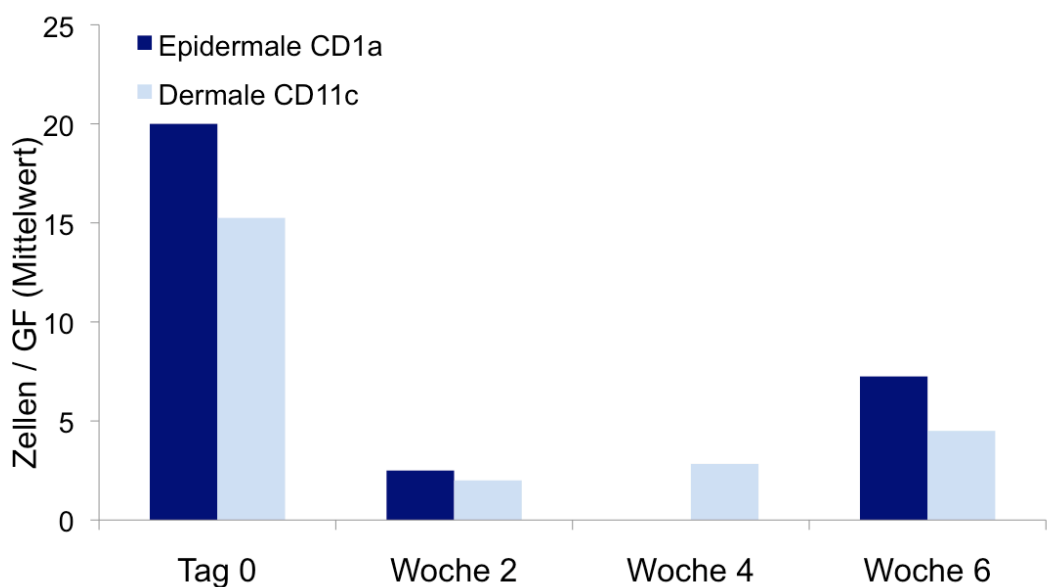


Abbildung 14) Semiquantitative Analyse von CD1a gefärbten LC und CD11c positiven DDC in Verlauf des Heilungsprozesses über 6 Wochen. CD1a positive LC sind in Woche 4 nicht mehr nachweisbar, CD11c positive DDC jedoch über den gesamten Zeitraum. Mittelwerte von 4 Gesichtsfeldern (GF) bei 400facher Vergrößerung.

Ab der 8. Woche des Experiments wurde eine zunehmende unspezifische Entzündung festgestellt. Diese manifestierte sich durch eine verstärkte Infiltration von CD3 positiven Zellen im Transplantat.

3.4. LANGERHANSZELLEPLETION MITTELS UVC STRAHLUNG

Zur Untersuchung des Effektes von UVC auf die Verteilung der Langerhanszellen in untransplantierter und transplantierter Haut, wurde ein Teil der zur Verfügung stehenden Hautproben mit UVC (254nm) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit 2 x 15 W über 30 min und wurde mit einem Abstand von 38 cm durchgeführt.

3.4.1. F410, F510, G410

In 24-Loch-Platten wurde eine Kultur angelegt, wobei ein Stück von 0,8 cm Durchmesser und 0,4 cm Dicke in 2 ml AIMV_{1%HS} mit 40mg Fluconazol kultiviert wurde. Es wurden Hautpräparate für die Zeitpunkte 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Bestrahlung angelegt (Abb.15). Proben des Versuchstages (Tag 0) sowie Präparate der Folgetage wurden für die Immunhistologie fixiert bzw. zusätzlich für die Erstellung eines *Epidermalsheet* vorbereitet. In beiden Ansätzen wurden LC mittels CD1a angefärbt und eine semiquantitative Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden auf diese Weise 3 Systeme getestet (F410, F510, G410; n=18).

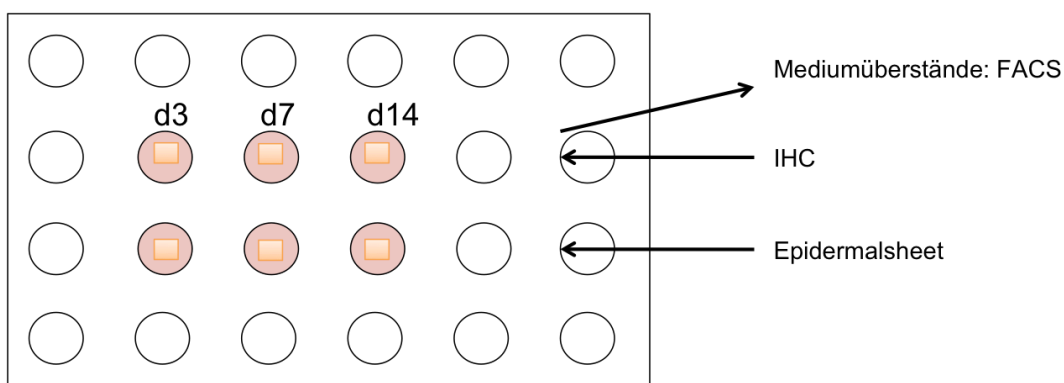


Abbildung 15) Aufbau der Kulturplatte mit Hautproben 3 bis 14 Tage nach Bestrahlung mit 2 x 15 W UVC, 30 min, Abstand 38cm. Ein identischer Ansatz wurde mit unbestrahlter Haut durchgeführt.

Auswertungen mit dem konfokalen LSM erfolgten am Tag der Bestrahlung bzw. 3 und 7 Tage im Anschluss (Abb.16). Die Lagerung von 14 Tagen beeinträchtigte die Epidermis der Proben so stark, sodass diese *Epidermalsheets* nicht ausgewertet werden konnten.

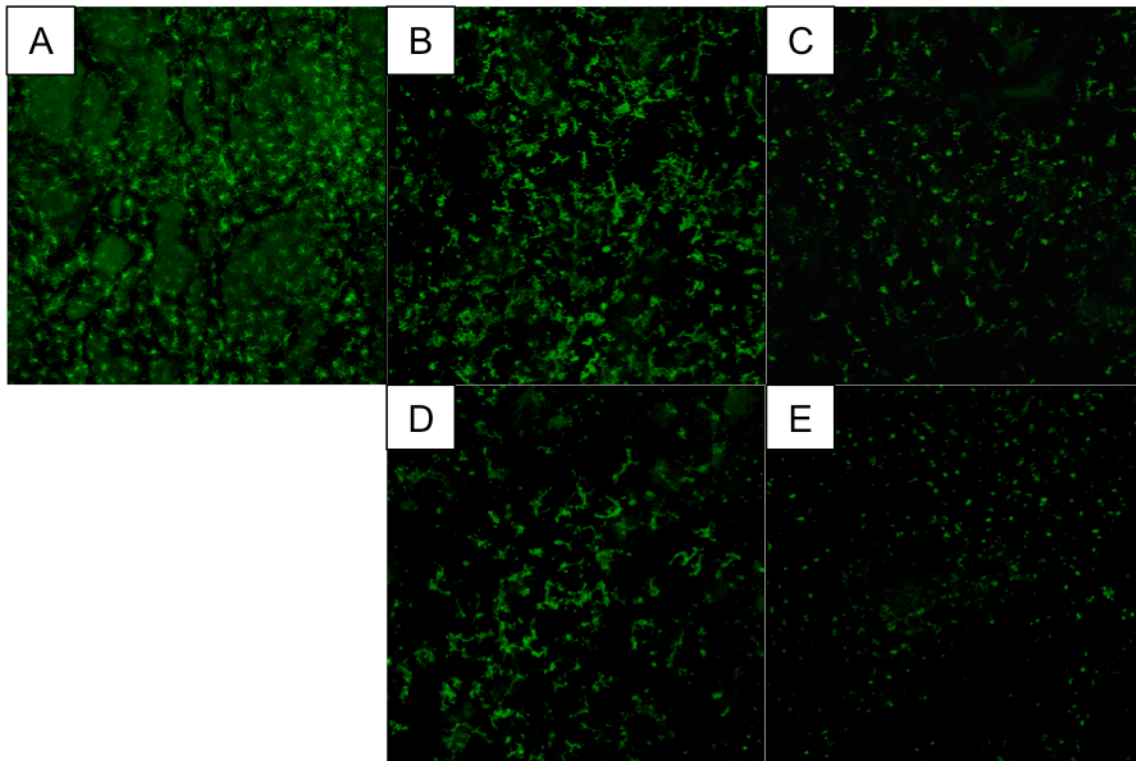


Abbildung 16) LSM Bilder der Epidermalsheets zu unterschiedlichen Zeitpunkten. A) Tag 0, Versuchsstart B) Tag 3, unbestrahlt C) Tag 7, unbestrahlt D) Tag 3, bestrahlt E) Tag 7, bestrahlt. 200 fache Vergrößerung konfokales LSM, Zeiss

Die semiquantitative Analyse der LSM Daten zeigte eine Reduktion der LC-Dichte im Laufe der Kulturzeit. Die Bestrahlung hatte einen signifikanten Verlust der Langerhanszellpopulation zur Folge (Abb.17). Die Auswertung der semiquantitativen Analyse der Immunhistochemie bestätigte dieses Ergebniss (ohne Abbildung).

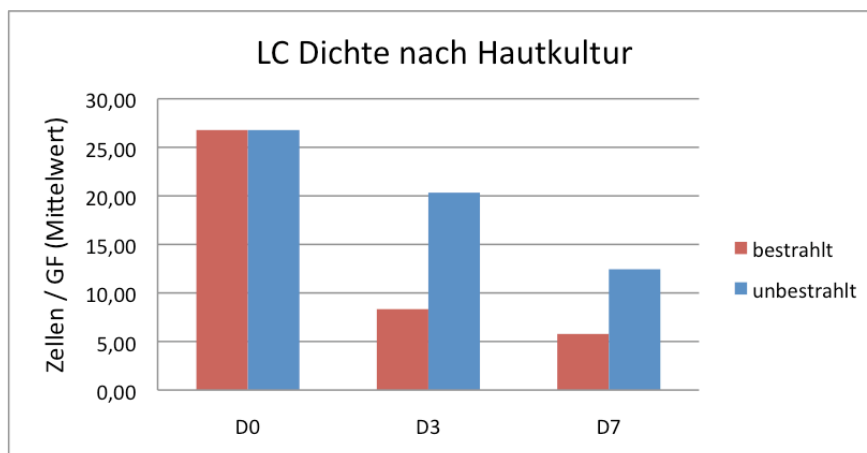


Abbildung 17) Semiquantitative Analyse der LC Dichte von LSM Daten kultivierter Haut unbestrahlt und bestrahlt. Bestrahlung mit 2 x 15 W, 30min, 38cm Abstand. Eine Reduktion der LC-Dichte ist im Lauf der Kulturzeit zu erkennen, wobei die bestrahlte Haut eine signifikant verringerte Dichte aufweist. Mittelwerte von 4 Gesichtfeldern (GF) 200µm² bei 200 facher Vergrößerung.

Die Medienüberstände der Kultur wurden am jeweiligen Versuchstag abgenommen und eine FACS-Färbung der vorliegenden Zellen durchgeführt. Eine Dreifachfärbung erfolgte mit CD45/HLA-DR/CD1a (FITC/PE/APC). Viabilität wurde mittels dem Avitalfarbstoff 7AAD (7-Aminoactinomycin) bestimmt.

Gemessen wurde der Anteil der CD45 und HLA-DR positiven Zellen. Der Anteil der HLA-DR/CD1a positiven LC Zellen lag mit <1% unterhalb der auswertbaren Messgrenze.

Die Menge der ausgewanderten HLA-DR positiven dendritischen Zellen der bestrahlten Probe überstieg an Tag 3 die der unbestrahlten um 4 Prozent. Insgesamt konnten maximal 10% HLA-DR positive Zellen gemessen werden. An Tag 7 nach Bestrahlung unterschied sich die Menge der ausgewanderten Zellen beider Proben um 0,3 Prozent, bei maximal 5,9 Prozent unbestrahlter HLA-DR positiver Zellen. An Tag 14 nach Bestrahlung war die Menge der gemessenen HLA-DR positiven Zellen in der unbestrahlten Probe um 2,5 Prozent erhöht, bei maximal 11,3 Prozent ausgewanderten Zellen. Die größte Menge avitaler Zellen konnte zum Zeitpunkt 14 Tage nach Bestrahlung, mit einem Maximum von anteilig 61 Prozent in der bestrahlten Probe gemessen werden. Insgesamt variierte die Menge der avitalen Zellen zu allen Zeitpunkten zwischen bestrahlt und unbestrahlt zwischen 1-7 Prozent, wobei die stärkste Abweichung am Tag 7 festgestellt werden konnte (31% bzw. 38% avitale Zellen) (Abb. 18).

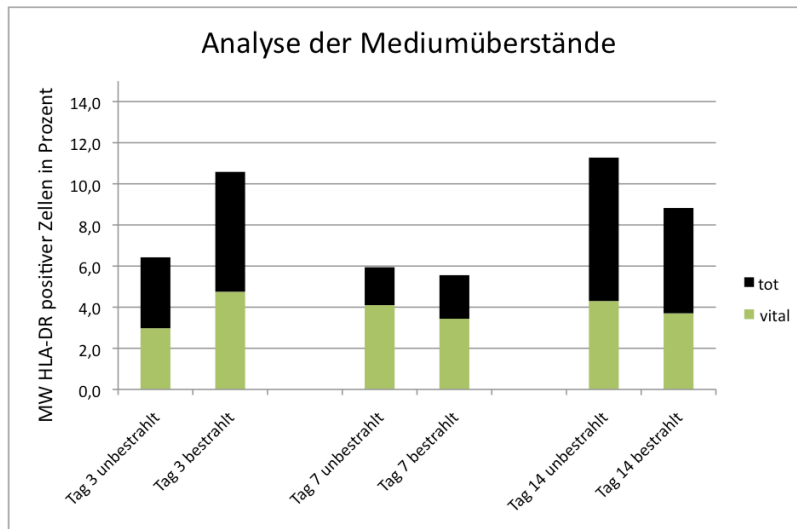


Abbildung 18) Analyse der Mediumüberstände an Tag 3, 7 und 14 nach Bestrahlung. Analyse CD45/HLA-DR positiver Zellen, Vitalitätsmessung mit 7AAD. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent, grün = vitale, schwarz= apoptotische Zellen. An Tag 3 war die Menge der ausgewanderten Zellen der bestrahlten Probe gegenüber der unbestrahlten Probe erhöht. An Tag 7 war die stärkste Abweichung der Apoptoserate (7%) messbar. An Tag 14 überstieg die Zellmenge im Überstand der unbestrahlten Probe die der bestrahlten.

3.4.1.1. *In vivo Untersuchungen*

Transplantationen wurden wie beschrieben mit bestrahlter und unbestrahlter Haut durchgeführt. Die Bestrahlung mit UVC (254nm) erfolgte über 30 min mit einem Abstand von 38cm. Es wurden 3 Systeme (F410, F510, G410, n=42) getestet, bestrahlt/unbestrahlt in einem Verhältnis von 1:1. Nach 5 Wochen wurde eine Biopsie des Transplantats entnommen und die LC-Dichte mittels IHC bestimmt. Anteilig wurde der Prozentsatz der Transplantate ermittelt, welche eine LC-Population aufwiesen. Dabei lag der Anteil der LC positiven Präparate um 9% höher, wenn die Haut zuvor bestrahlt worden war (Abb.19).

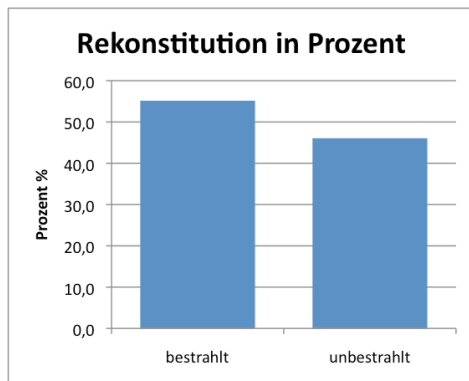


Abbildung 19) Prozentualer Anteil an LC positiven Transplanten von bestrahlter und unbestrahlter Haut nach 5 Wochen. Der Anteil der bestrahlten Gruppe liegt mit 55 % über dem Anteil der unbestrahlten Gruppe 46%, n=21/Gruppe.

Von diesen positiven Proben wurde eine semiquantitative Analyse der LC-Dichte durchgeführt. Es wurde gegen CD1a und CD207 gefärbt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Dichte der LC in den Präparaten gesteigert war, welche zuvor bestrahlt worden waren (Abb.20).

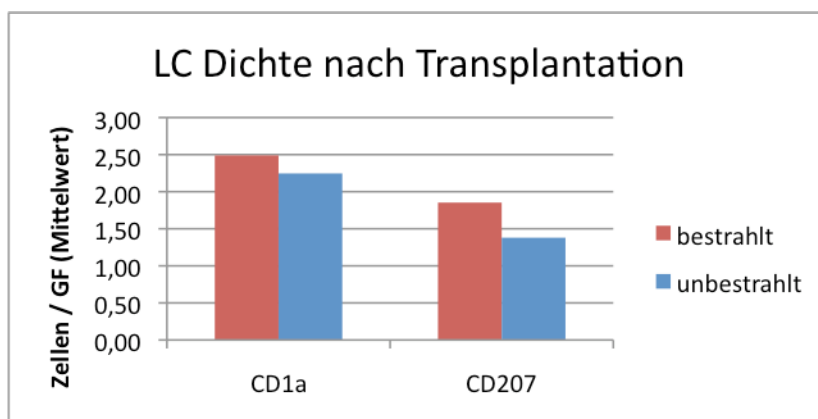


Abbildung 20) Vergleich der LC-Dichte 5 Wochen nach Transplantation in LC positiven Transplantaten. In der Gruppe der bestrahlten Transplantate (rot) ist die Dichte der LC sowohl für dem Marker CD1a als auch für den Marker CD207 erhöht. Mittelwerte von 4 Gesichtsfeldern (GF) bei 400facher Vergrößerung; bestrahlt n=11, unbestrahlt n=8.

3.5. AUSLÖSEN EINER ALLOGENEN T-ZELLANTWORT

Humane Haut wurde wie beschrieben (Abschnitt 2.2.14.) auf NSG-Mäuse transplantiert. Nach 7 Wochen waren die Transplantate eingeeilt und es war von einer Repopulation der LC auszugehen.

Aus Blut des Hautspenders wurden wie beschrieben DC generiert (Abschnitt 2.2.3.) und aus einem bestellten Buffycoat über MACS Isolation CD8 positive T-Zellen gewonnen (Abschnitt 2.2.4.). Ein Teil wurde zur Stimulation in einer MLDC mit DC des Hautspenders zusammengeführt und der Rest wurde portioniert kryokonserviert (Abschnitt 2.2.7.) Die Kultivierung der MLDC erfolgte wie beschrieben (Abschnitt 2.2.5.). Im Anschluss wurden die Zellen im ELISpot getestet (Abschnitt 2.2.6.). Die stimulierten Zellen wurden im Versuch den transplantierten Tieren infundiert (Abb. 15). Auch der HLA-Typ des Hautspenders wurde bestimmt (Transfusionszentrale Mainz).

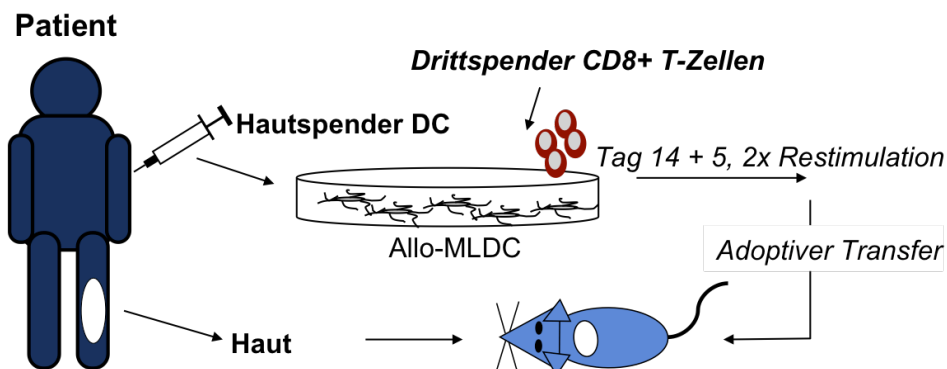


Abbildung 21) Schematischer Versuchsaufbau. Haut vom Spender wurde auf NSG-Mäuse transplantiert und die Wundheilung abgewartet. In der Zwischenzeit wurden aus Blut des Spenders DC generiert und diese in einer MLDC zusammen mit CD8 positiven T-Lymphozyten eines Buffycoat-Spenders kultiviert. Nach einer Kultivierung über 19 Tage und Restimulationen mit bestrahlten DC des Hautspenders konnten reaktive CD8 positive T-Zellen in die transplantierten Mäuse i.v. transferiert werden. Die gesteigerte Reaktivität wurde mittels ELISpot Analyse gemessen.

3.5.1. S109 und S209

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Systeme S109 und S209 gemeinsam beschrieben, da sie simultan und identisch durchgeführt wurden.

3.5.1.1. Charakterisierung S109

Der HLA-Typ des Hautspenders und des T-Zellspenders lautete:

	A	B	C
Hautspender	2/3	13/27	2/6
T-Zellspender	24/26	51	7

Haut- und T-Zellspender waren in den 6 HLA-Klasse-I Allelen nicht übereinstimmend. Die Reinheit der isolierten CD8 positiven Zellen, welche für die MLDC verwendet wurden, wurde nicht ermittelt.

Der ELISpot der im System S109 verwendeten Zellen von Tag 19 zeigt, dass durch die Stimulation *in vitro* in diesem Fall keine Steigerung der Reaktivität erreicht werden konnte. Die Reaktivität der unstimulierten CD8 positiven Zellen lag um das 1,6 fache höher als die *in vitro* generierten Zellen (ohne Abbildung). Auch in der Spontanfreisetzung, ohne zusätzliche Stimulation, wurde von den CD8 Zellen mehr INF γ produziert.

3.5.1.2. Charakterisierung S209

Der Hautspender und der T-Zellspender besaßen den HLA-Typ:

	A	B	C
Hautspender	2/29	14/37	6/8
T-Zellspender	1/2	8/51	7

Die Zellen wiesen eine Übereinstimmung im HLA-Klasse-I-Allel A2 auf. Die Reinheit der isolierten CD8 positiven Zellen, welche für die MLDC verwendet wurden, wurde mittels FACS-Analyse ermittelt und betrug 88% (Messung von CD3/CD8 positiven Zellen, ohne Abbildung).

Die T-Zellen der MLDC zeigten im Gegensatz zu den unstimulierten CD8-positiven Zellen eine 140 fach erhöhte Reaktivität im IFN- γ -ELIspot (Abb.23).

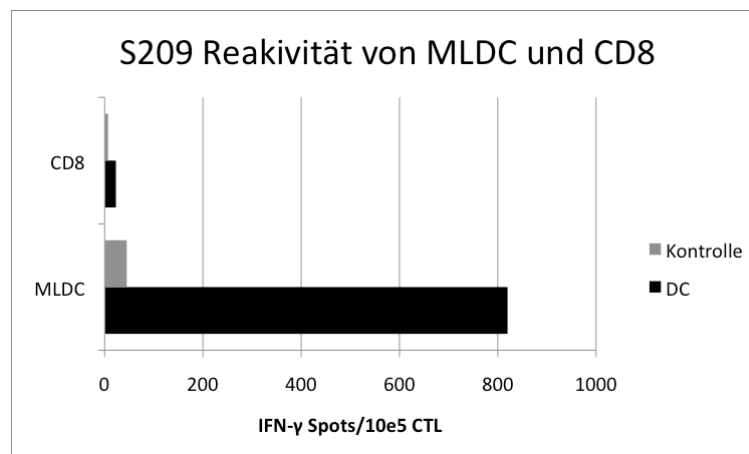


Abbildung 22) ELIspot S209. Eingesetzt wurden 20.000 MLDC (Kulturtag 19), 100.000 CD8 pro well. Die Stimulation erfolgte mit 5000 DC des Hautspenders. Kultur über 20h in AIM V_{10%HS}. Analyse mit Axio Imager M.1 (Zeiss)

Die transplantierten Tiere (n=6 bzw. n=9) wurden in je 3 Kohorten zu 2 Tieren bzw. 3 Kohorten zu 3 Tieren aufgeteilt. In beiden Versuchen erfolgte der Ablauf analog.

Der ersten Kohorte wurden 1×10^6 unstimulierte, CD8 positive T-Zellen, der zweiten Kohorte 1×10^6 in der MLDC vorstimulierte, CD8 positive T-Zellen i.v. appliziert. Die dritte Kohorte (Kontrolle) erhielt PBS.

Die Tiere wurden jeden zweiten Tag gewogen und der allgemeine Habitus begutachtet um eine unerwünschte Abstoßungsreaktion der Tiere auf die T-Zellen auszuschließen. Ebenso wurde das Transplantat auf Anzeichen einer Entzündung

kontrolliert.

Nach 2-5 Tagen zeigten die Transplantate der MLDC Gruppe Anzeichen einer Entzündung und erschienen gerötet. Der Versuch wurde 7 Tage nach Auftreten der Rötung beendet, die Tiere durch CO₂-Begasung getötet und das Transplantat entnommen. Während der gesamten Versuchszeit traten keine weiteren Anzeichen einer Entzündung auf. Auch ließ sich kein Gewichtsverlust oder ein veränderter Habitus feststellen.

Die entnommenen Transplantate wurden in 4% Formalin fixiert und wie beschrieben immunhistochemisch aufgearbeitet. Ebenso wurde eine H&E-Färbung durchgeführt (Abb.23).

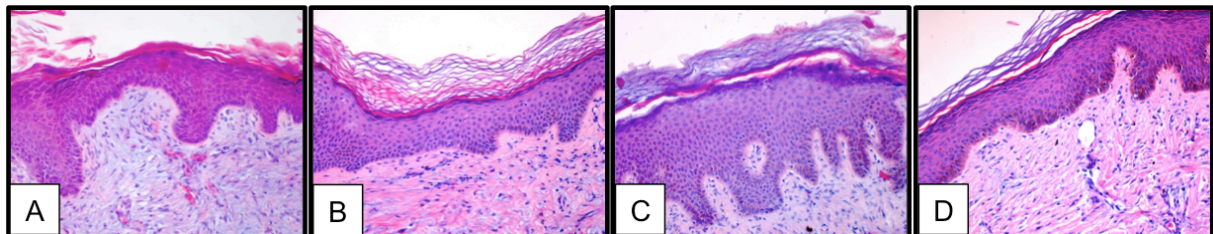


Abbildung 23) H&E Färbung der Kontrolle S109 **A** und der CD8 Gruppe **B**, sowie S209 H&E Färbung der Kontrolle **C** und der CD8 Gruppe **D**, zeigten keine histologischen Anzeichen für eine Entzündungsreaktion. Akantose und Hyperparakeratose war in allen Proben nachweisbar. Vergrößerung 200x

Die H&E-Färbung zeigte in der Kontrolle (A S109; C S209) und in der CD8-Gruppe (B S109, D S209) Akanthose und Hyperparakeratose. Zeichen für Entzündung ließen sich nicht feststellen.

Die bereits während des Versuchs sichtbar gerötete MLDC-Gruppe wies in beiden Versuchen einige Besonderheiten auf. Neben Akanthose und Hyperparakeratose konnten deutliche Zeichen einer Entzündung festgestellt werden (Abb.24). Zu diesen Anzeichen gehörten: T-Zellinfiltrate (A), Spaltbildung (B), Ablösung der Epidermis (C), vereinzelte Apoptosen der Zellen in der Epidermis (D), und Spongiose (E). Alle diese pathologischen Veränderungen weisen deutlich auf eine massive Entzündung der Haut hin.

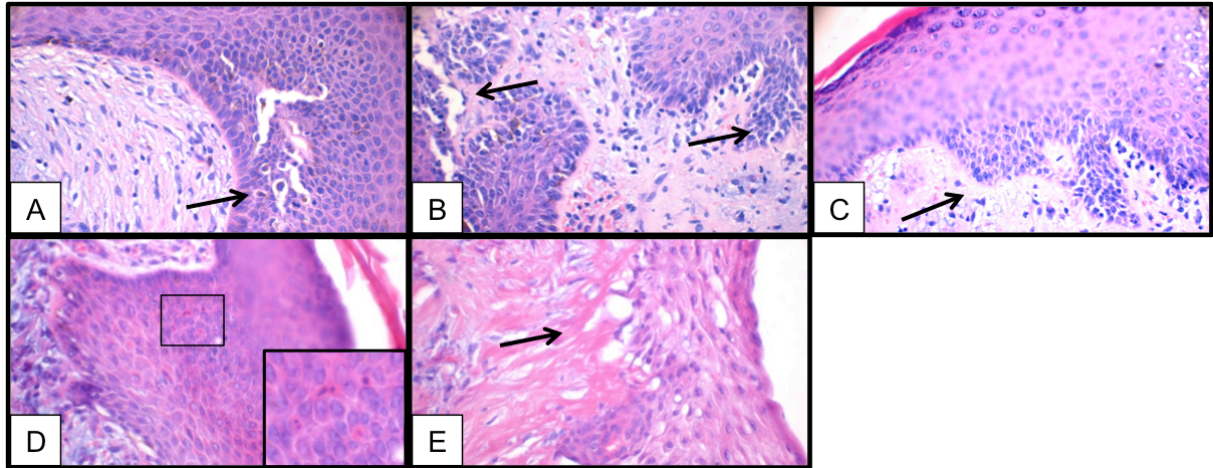


Abbildung 24) Zusammenfassung der MLDC-Gruppen von S109 und S209. Die Tiere wiesen unterschiedliche Zeichen einer Entzündung auf. Exemplarisch sind aus diesen Versuchen deutliche Entzündungserscheinungen, wie **A** T-Zellinfiltrate (S109), **B** Spaltbildung (S109), **C** Ablösung der Epidermis (S109), **D** Einzelzellapoptosen (S209), und **E** Spongiose (S209) dargestellt (Pfeile). Vergrößerung 400x

3.6. ROLLE DER LC

Um die Rolle der LC als Zielzellen der Entzündungsreaktion genau zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die applizierte T-Zelldosis langsam gesteigert wurde. Auf diesem Wege sollte die Dosisabhängigkeit untersucht werden.

3.6.1. S108

Der HLA-Typ des Hautspenders und des T-Zellspenders lautete:

	A	B	C
Hautspender	24/29	7/57	6/7
T-Zellspender	3	13/35	4

Haut- und T-Zellspender waren in den 6 HLA-Klasse-I Allelen nicht übereinstimmend. Humane Haut wurde wie beschrieben auf NSG-Mäuse transplantiert (Abschnitt 2.2.14.). Nach 7 Wochen waren die Transplantate verheilt und es war von einer Repopulation von LC auszugehen.

Aus Blut des Hautspenders wurden wie beschrieben DC generiert und aus einem bestellten Buffycoat über MACS Isolation CD8 positive T-Zellen gewonnen (Abschnitte 2.2.3; 2.2.4.). Die Reinheit der Isolierten CD8 positiven Zellen, die für die MLDC verwendet wurden, wurde mittels FACS Analyse ermittelt und betrug 92% (Messung von CD3 und CD8 doppelpositiven Zellen, ohne Abbildung). Diese wurden zur Stimulation in einer MLDC mit DC des Hautspenders zusammengeführt und Reste portioniert kryokonserviert. Die Kultivierung der MLDC erfolgte wie beschrieben (Abschnitt 2.2.5.). Nach der Kulturzeit wurden die Zellen im ELISpot getestet (Abb.25).

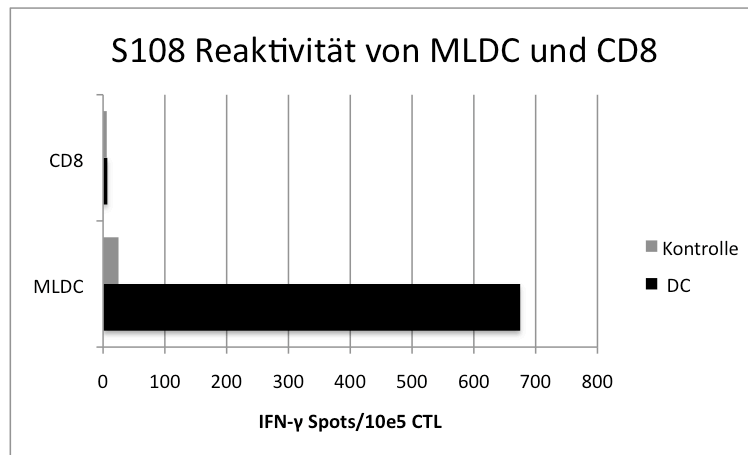


Abbildung 25) ELISpot S108 . Zum Einsatz kamen 20.000 MLDC (Kulturtag 19), 100.000 CD8 pro well. Die Stimulation erfolgte mit 5000 DC des Hautspenders. Kultur über 20h in AIM V_{10%HS}. Analyse mit Axio Imager M.1 (Zeiss)

Der ELISpot zeigte eine Steigerung der Reaktivität der MLDC gegenüber den unstimulierten CD8 positiven T-Zellen. Eine Steigerung der Reaktivität um den Faktor 96 konnte nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde eine Blockade von HLA-Klasse-I-Molekülen mit dem Antikörper W6/32 durchgeführt (ohne Abbildung). Die Blockade führte zu keiner Einschränkung der Reaktivität.

Die transplantierten Tiere wurden in 3 Kohorten zu je 2 Tieren aufgeteilt (n=6).

In diesem Versuch erfolgte eine Applikation von ansteigenden Dosen alle 14 Tage (Abb.26).

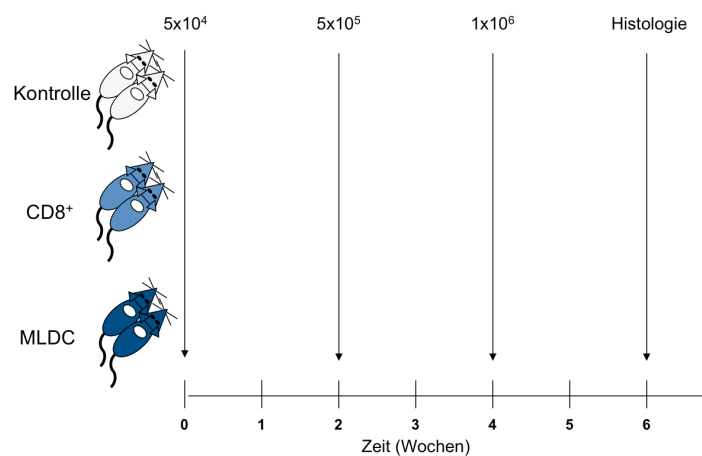


Abbildung 26) Versuchsaufbau von S108. Die Applikation von T-Zellen erfolgte in ansteigenden Dosen. Die erste Dosis von 5×10^4 Zellen wurde nach 14 Tagen auf 5×10^5 und nach weiteren 14 Tagen auf 1×10^6 Zellen pro Tier erhöht. Versuchsende war die sechste Woche nach Versuchsbeginn.

Die erste Dosis von 5×10^4 Zellen wurde gefolgt von 5×10^5 und 1×10^6 Zellen pro Tier (Abb.26). Es wurden unstimulierte, CD8 positive T-Zellen und in der MLDC vorstimulierte, CD8 positive T-Zellen i.v. appliziert. Die dritte Kohorte verblieb als Kontrolle und erhielt lediglich PBS. Die Tiere wurden alle zwei Tage gewogen und das Transplantat auf Anzeichen einer Entzündung kontrolliert.

Sieben Tage nach der ersten Dosis zeigten die Transplantate der MLDC Gruppe eine Rötung. Diese Rötung verschwand nach zwei weiteren Tagen.

Eine Woche nach Applikation der zweiten Dosis konnte eine transiente Rötung der Transplantate der CD8 Gruppe festgestellt werden. Die MLDC Gruppe blieb unverändert. Der Versuch wurde in Woche 6 nach T-Zellgabe beendet und die Tiere durch CO₂-Begasung getötet und das Transplantat entnommen. Es trat während der Versuchszeit keine weitere Rötung der Transplantate auf. Auch konnte kein Gewichtsverlust oder Veränderungen im Habitus festgestellt werden.

Die entnommenen Transplantate wurden in 4% Formalin fixiert und wie beschrieben immunhistochemisch aufgearbeitet. Ebenso wurde eine H&E-Färbung durchgeführt (Abb.27).

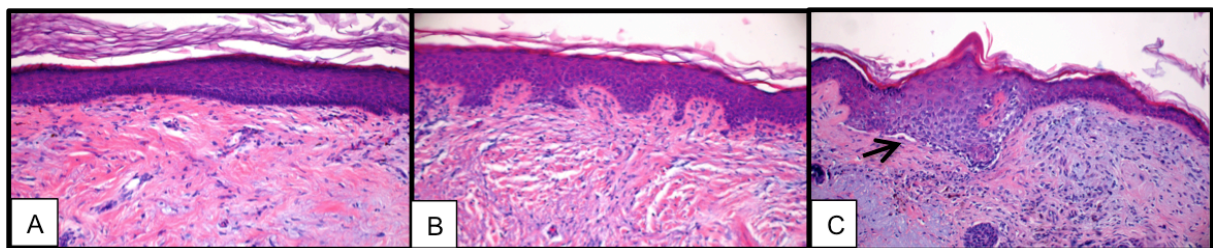


Abbildung 27) Exemplarische Darstellung der H&E Färbung der Kontrolle **A**, der CD8 **B**, und der MLDC **C** Gruppe des Versuchs S108. Die Kontrolle und CD8 weisen keine histologischen Anzeichen von Entzündung auf. Auf Abbildung **C** sind jedoch Spaltbildung und infiltrierende T-Zellen zu erkennen (Pfeil). Vergrößerung 200x

Die H&E Färbung zeigte bei der Kontrolle (A) und der CD8 Gruppe (B) ein unauffälliges Hautbild. Es waren keine Anzeichen für eine Entzündung zu finden. Im Gegensatz dazu zeigte die Färbung der MLDC Gruppe (C) eine deutliche Spaltbildung (Pfeil) und T-Zellinfiltrate.

Um die LC Population dieser Transplantate zu untersuchen, wurden diese mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. Dabei wurde gegen die spezifischen Marker CD207 und CD1a gefärbt (Abb.28).

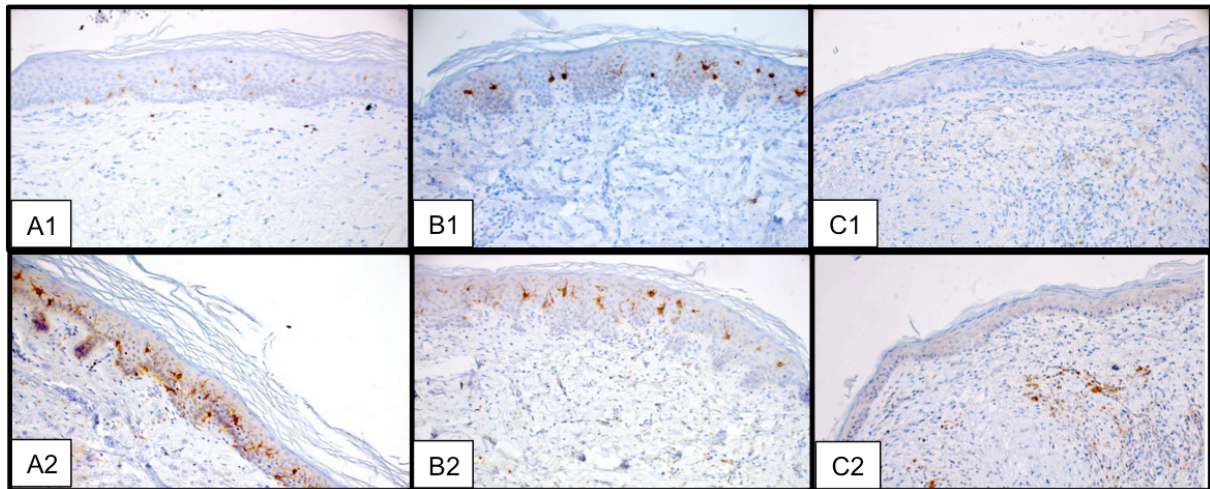


Abbildung 28) Färbung der LC, S108. CD207 (A1-C1) **A1** Kontrolle, **B1** CD8, **C1** MLDC. Darunter CD1a (A2-C2) **A2** Kontrolle, **B2** CD8, **C2** MLDC. In der Kontrolle ist eine deutliche CD1a und CD207 positive Population in der Epidermis vorhanden, welche bei B1/B2 in ihrer Menge reduziert erscheint. In C1/C2 ist sie vollständig verschwunden. Vergrößerung 200x

Die Kontrolle besaß eine deutliche LC Population in der Epidermis, welche sowohl CD207 (A1) als auch CD1a (A2) positiv war. Diese war bei der CD8 Gruppe (B1/B2) in ihrer Menge reduziert und bei der MLDC Gruppe (C1/C2) nicht mehr nachweisbar. Bei der MLDC Gruppe konnte eine CD1a Färbung in der Dermis nachgewiesen werden (C2).

Die CD11c positiven Zellen befinden sich in der Dermis und konnten in der Kontrolle, sowie in der CD8 und MLDC Gruppe nachgewiesen werden (Abb.29). Um einen genaueren Vergleich zu den LC durchführen zu können, wurde eine semiquantitative Analyse der Präparate durchgeführt.

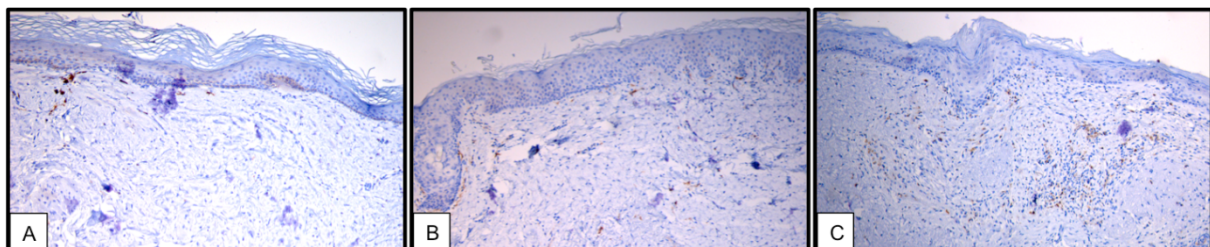


Abbildung 29) Färbung von CD11c positiven DDC, S108. **A** Kontrolle, **B** CD8, **C** MLDC. CD11c positive Zellen befinden sich in der Dermis und sind in allen Proben gleichmäßig enthalten. Vergrößerung 200x

Dafür wurden 4 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 400x gezählt, gemittelt und analysiert. Gezählt wurden CD207 positive LC und CD11c positive DDC (Abb.30).

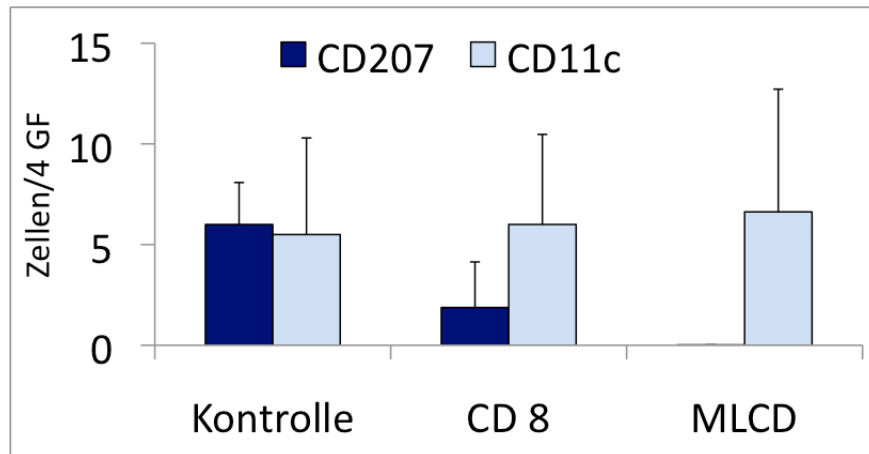


Abbildung 30) Semiquantitative Analyse der CD207 und CD11c positiven Zellen von Kontrolle, CD8 und MLDC (S108) im Mittel. Es wurden 4 Gesichtsfelder mit einer Vergrößerung von 400x ausgezählt. Verglichen mit der Kontrolle, war die Menge der LC reduziert in der CD8 Gruppe und völlig verschwunden in der MLDC Gruppe.

Verglichen mit der Kontrolle konnte nach Applikation von unstimulierten CD8 positiven T-Zellen eine Reduktion der Menge an LC in der Epidermis festgestellt werden. Nach Applikation von *in vitro* generierten MLDC waren keine LC nachweisbar. Die CD11c positive Population war in allen Proben relativ gleichmäßig enthalten und unterlag nach T-Zellgabe keinen Schwankungen (Abb. 30).

Zum Nachweis, dass Grenzflächendermatitis durch infiltrierende T-Zellen ausgelöst worden war, wurde eine Färbung von CD3 durchgeführt (Abb.31).

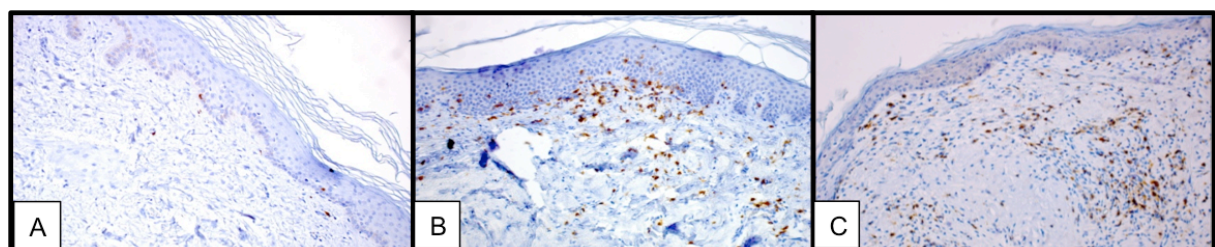


Abbildung 31) Färbung der CD3 positiven T Lymphozyten. **A** Kontrolle, **B** CD8, **C** MLDC. In der Abbildung der Kontrolle sind kaum CD3 positive Zellen detektierbar. Deutliche Infiltrate in der Epidermis sind sowohl nach Gabe von CD8, als auch von MLDC erkennbar. Vergrößerung 200x

In der Kontrolle (A) waren kaum T-Zellen nachweisbar. Nach Infusion von unstimulierten CD8 positiven (B) als auch *in vitro* generierten MLDC (C), fanden sich deutliche T-Zellinfiltrate, welche sich nicht auf die Dermis beschränkten, sondern auch in der Epidermis sichtbar waren. Zur genaueren Analyse wurde eine semiquantitative Zählung der infiltrierenden T-Zellen durchgeführt (Abb.32).

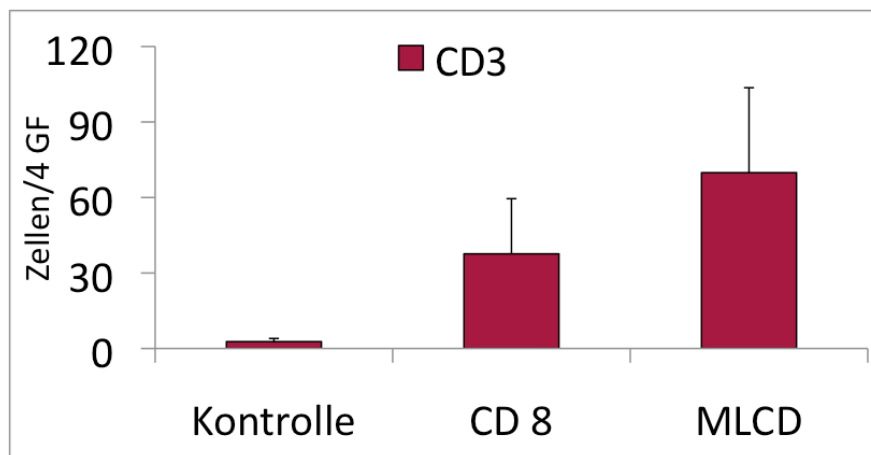


Abbildung 32) Semiquantitative Analyse CD3 positiver Lymphozyten in der Dermis der Kontrolle, CD8 und MLDC (S108) im Mittel. Es wurden 4 Gesichtsfelder mit einer Vergrößerung von 400x ausgezählt. Die stärkste Infiltration war in der MLDC Gruppe nachweisbar, die T-Zellzahl war signifikant erhöht.

Im Gegensatz zur Kontrolle war in allen Tieren mit applizierten allogenen T-Zellen ein T-Zellinfiltrat nachweisbar. Die T-Zellzahl war bei den Tieren mit MLDC T-Zellen signifikant gesteigert.

3.7. LC DEFIZIENTE TRANSPLANTATE

Weitere Versuche wurden durchgeführt, um die Rolle der LC im Bezug auf eine Entzündungsreaktion zu untersuchen. Unter anderem wurde Haut verwendet, welche durch Vorbehandlung des Hautspenders bestrahlt worden war und zum Zeitpunkt der Transplantation keine LC aufwies.

3.7.1. S208

Nach der Wundheilung wurden die transplantierten Tiere in 4 Kohorten zu je 2 Tieren aufgeteilt (n=8). Sie erhielten T-Zellen in ansteigender Dosierung analog zum Versuch S108 (5×10^4 , 5×10^5 , 1×10^6 unstimulierte CD8 positive T-Zellen und stimulierte MLDC im Abstand von 14 Tagen).

Zusätzlich wurden bei einer weiteren Gruppe autologe CD8 positive T-Zellen des Hautspenders appliziert. Diese Zellen wurden zuvor nicht stimuliert, so dass man davon ausgehen konnte, in diesem Fall keine Entzündungs- oder Abstoßungsreaktion auszulösen. Diese Gruppe bildete somit eine weitere Kontrolle. Die vierte Kohorte verblieb als unbehandelte Kontrolle und erhielt lediglich PBS (Abb.33).

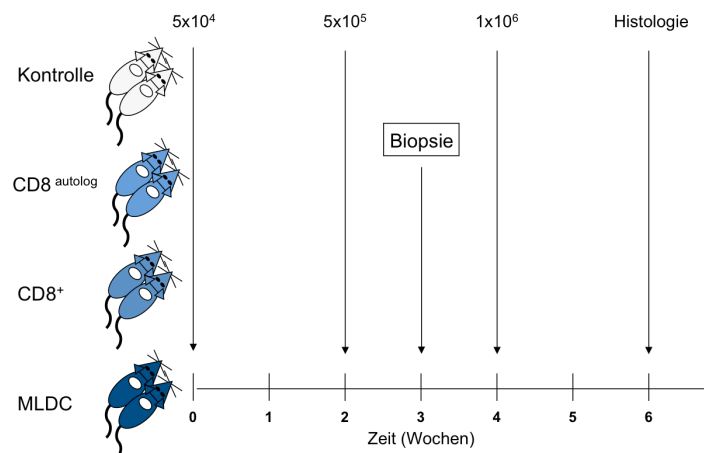


Abbildung 33) Versuchsaufbau S208. Die Applikation von T-Zellen erfolgte in ansteigenden Dosen. Die erste Dosis von 5×10^4 Zellen wurde nach 14 Tagen auf 5×10^5 und nach weiteren 14 Tagen auf 1×10^6 Zellen pro Tier erhöht. An Tag 21 wurde eine Biopsie der Kontrolle, CD8^{autolog}, CD8 und MLDC durchgeführt. Versuchsende war die sechste Woche nach Versuchsbeginn

Die Tiere wurden jeden zweiten Tag gewogen, das Transplantat und die Tiere selbst auf Anzeichen einer Entzündung kontrolliert. Vor dem Transfer der Zellen in die Tiere wurde ein ELISpot der eingesetzten Zellen angefertigt (Abb.34).

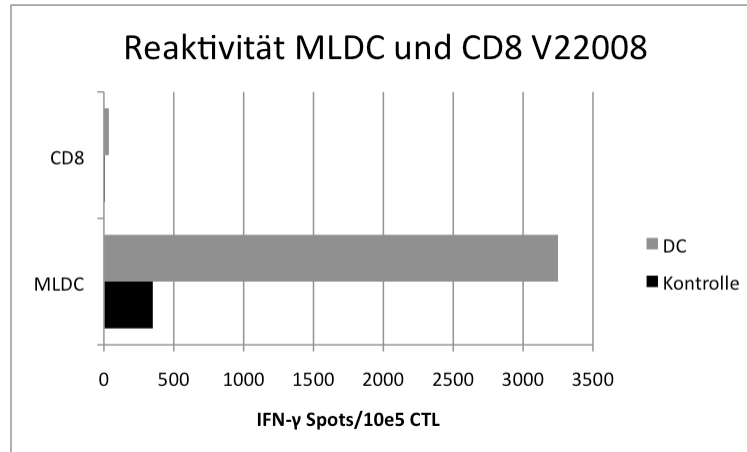


Abbildung 34) ELISpot S208. Zum Einsatz kamen 1000 MLDC (Kulturtag 19), 100.000 CD8 pro well. Die Stimulation erfolgte mit 20.000 DC des Hautspenders. Kultur über 20h in AIM V_{10%HS}. Analyse mit Axio Imager M.1 (Zeiss)

Nach Analyse lautete der HLA-Typ des Hautspenders und des T-Zellspenders:

	A	B	C
Hautspender	1/32	8/38	7/12
T-Zellspender	1/2	8/51	7

Somit lag eine Übereinstimmung in jedem der drei HLA-Klasse-I-Allele vor. Die Reinheit der isolierten CD8 positiven Zellen, welche für die MLDC verwendet wurden, wurde nicht ermittelt.

Der Elispot des Systems S208 zeigt, dass durch die Stimulation *in vitro* in diesem Fall eine Steigerung der Reaktivität um das 91 fache erreicht werden konnte (Abb.34). Man beachte den Einsatz von 1000 MLDC verglichen mit 100.000 CD8 positiven unstimulierten Zellen. Nach Applikation der ersten und zweiten Dosis zeigten sich keinerlei Anzeichen einer Entzündung oder eine Hautrötung. An Tag 21 wurde eine Biopsie bei je einem Tier aus jeder Gruppe durchgeführt und immunhistochemisch untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass in keinem der Transplantate LC zu finden waren. Es ließen sich jedoch bei Kontrolle, CD8^{autolog} und CD8 T-Zellen nachweisen (Abb.35).

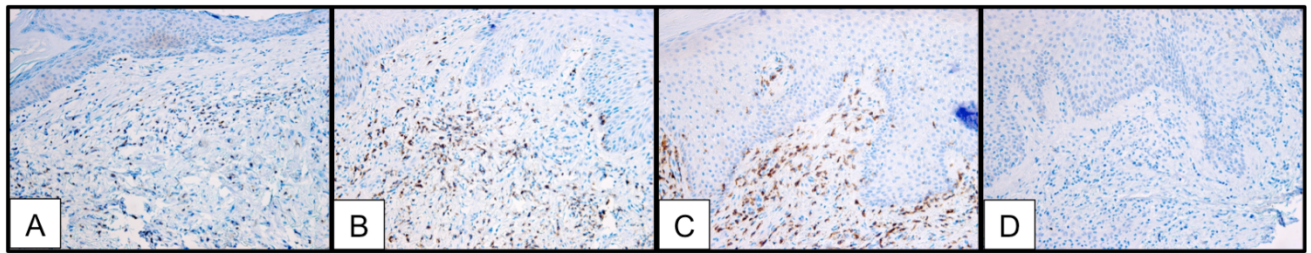


Abbildung 35) CD3 Färbung der Biopsien der Kontrolle (A), CD8^{autolog} (B), CD8 (C), MLDC (D) S208. T-Zellinfiltrate sind in allen Proben feststellbar, außer der MLDC Gruppe. Vergrößerung 200x

Das Vorhandensein von T-Zellen in der Kontrolle und der autologen CD8 Gruppe ließ eine Entzündung des Hautareals vor der Transplantation vermuten. In der Dermis der Gruppe, welche CD8 positive Lymphozyten aus Buffycoat-Material erhalten hatte, waren ebenfalls T-Zellen nachweisbar. Lediglich die Gruppe der stimulierten MLDC hatte kein nachweisbares T-Zellinfiltrat.

Während der weiteren Versuchsdauer von 3 Wochen zeigte sich bei keinem der Tiere eine sichtbare Hautrötung oder Zeichen einer Entzündung. Am Versuchsende wurden die Transplantate in 4% Formalin fixiert und wie bereits beschreiben der Immunhistologie zugeführt (Abschnitt 2.2.9.).

Die immunhistologische Auswertung des Versuchsendes ergab, dass die Transplantate in Bezug auf LC weiterhin negativ waren (Färbung von CD1a und CD207, nicht Abgebildet). Jedoch waren in allen Proben T-Zellinfiltrate enthalten. Auch bei der MLDC Gruppe hatte sich ein massives T-Zellinfiltrat gebildet (Abb.36, B), welches sogar bis in die Epidermis vordrang. Es handelte sich bei diesen Zellen um CD8 positive CTL (C), welche dermal und epidermal nachgewiesen werden konnten.

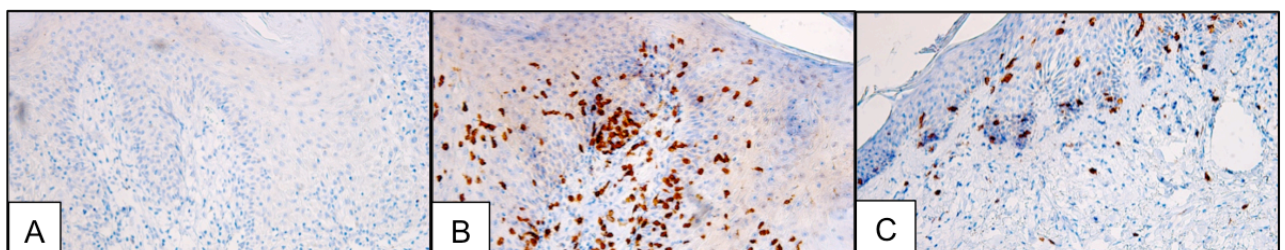


Abbildung 36) Versuchsende: MLDC, S208 A Färbung der LC mittels CD1a B Färbung CD3, massives T-Zellinfiltrat C CD8 positive T-Zellen infiltrieren Epidermis. Vergrößerung 200x

Zusätzlich zur histologischen Auswertung wurde von der Kontrolle und der autologen Kontrolle eine Kultur der infiltrierenden Lymphozyten (TIL, engl.: „*Tumor infiltrating lymphocyte culture*“) durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde je ein Transplantat aus beiden Gruppen in einer 24-Loch Platte mit AIM V_{10%} und IL2 (1000U/ml) über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Nach 21 Tagen wurde die Haut entfernt, ausgewanderte Zellen ab gespült und in Kooperation mit Herrn Dr. Klaus Bender (Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz) in STR-Assays (engl., *short tandem repeat*) analysiert. Um einen Vergleich durchführen zu können, erhielt er zusätzlich Zellen des Hautspenders und des T-Zellspenders. Die Analyse der Rechtsmedizin ergab, dass sich sowohl in der Kultur der Kontrolle (ohne Applikation von T-Zellen) als auch in der Kultur der autologen Gruppe nur Zellen des Hautspenders befanden. Somit stammte das T-Zellinfiltrat in beiden Kontrollgruppen nachweislich vom Hautspender selbst und es lag keine Verwechslung vor.

4. DISKUSSION

4.1. XENOTRANSPLANTATE ALS MODELL FÜR HUMANE HAUTERKRANKUNGEN

Die Methodik der Hauttransplantation von humaner Haut auf Versuchstiere wurde bereits in der Vergangenheit angewendet, um die menschliche Hautbiologie und Entzündungsprozesse *in vivo* zu analysieren. Dazu wurden unterschiedliche Mausstämme verwendet, welche aufgrund von genetischen Manipulationen ein solches xenogenes Transplantat tolerieren. Dazu zählen u.a. der athymische *nude*, der SCID und der NSG Stamm [113]. Diese Modelle waren hilfreich, um unterschiedliche entzündliche Krankheiten der Haut zu untersuchen, vor Allem die Psoriasis.

Erste Untersuchungen, wurden mit dem athymischen *nude* Stamm durchgeführt. Der Thymus ist bei diesen Tieren verkümmert und reife T-Zellen fehlen. Somit ist eine Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten nicht möglich. Ihre Reaktion auf T-Zell unabhängige Antigene ist jedoch normal und sie besitzen funktionale NK-Zellen [114]. Es konnte gezeigt werden, dass in Xenotransplantaten dieser Tiere das klinische Bild der Psoriasis für mehr als 2 Monate erhalten werden konnte, gesunde Haut jedoch spontan Anzeichen der Psoriasis entwickelte (Koebner-Phänomen) [115, 116]. Der SCID Stamm (engl.: *severe combined immunodeficiency*), welchem durch einen Defekt in der DNA Reparatur funktionale T- und B- Zellen fehlen, toleriert ebenfalls xenogene Transplantate und wird für die Psoriasisforschung genutzt. Die Transplantate erhielten den erkrankten Hautzustand über Monate und wurden bereits für präklinische Studien von neuen biologischen Agentien verwendet. In diesem Fall wurde eine Blockade des IL-15 Rezeptors verwendet und es konnten so histologische Anzeichen der Psoriasis, wie Akanthose und Parakeratose, deutlich reduziert werden [117]. Ebenfalls wurden Versuche mit gesunder Haut durchgeführt, um die zellulären Komponenten zu identifizieren, die an der Ausbildung von psoriatischen Läsionen maßgeblich beteiligt sind. Dafür wurden Entzündungsmediatoren, wie TNF- bzw. GM-CSF, oder aktivierte autologe Immunozyten intradermal injiziert. Auf diese Weise wurde die elementare Rolle von aktivierten autologen T-Zellen bei der Entstehung von Psoriasis im Mausmodell deutlich [118]. In diesem Modell bleibt das Koebler-Phänomen aus, jedoch entwickelt

der SCID Stammt spontan Thymome oder Lymphome und hat so eine eingeschränkte Lebensdauer. Auch schrumpfen die Xenotransplantate im Prozess der Einheilung und bilden Neoplasien aus [119].

In vivo Modelle für humane GvHD fehlten bislang. Vor einigen Jahren konnte durch eine Applikation von humanen PBMC in immunsupprimierte Mäuse eine Entzündung ausgelöst werden, welche als Modell für die GvHD genutzt wurde. Dabei wurden PBMC i.p. oder i.v. appliziert und das Auftreten von GvHD dokumentiert [120, 121]. Auch eine Infusion von reinen CD3 positiven T-Zellen induzierte eine solche GvHD ähnliche Reaktion. Diese Methoden können zur Analyse der T-Zelle als Effektor genutzt werden, allerdings ist in diesem Fall die GvHD allein von der T-Zellantwort oder einem Zytokinsturm abhängig. Die Funktion der APC blieb dabei bisher ungeachtet.

Donor T-Zellen sind die Effektoren der GvHD und lymphozytenmedierte Immunantworten werden durch Antigenpräsentation der DC initiiert. Dadurch kommt ihnen eine besondere Rolle zu. Zur Reduktion des Ausmaßes einer GvHD beim Menschen, gibt es verschiedene Strategien. Dabei wird der Fokus auf die Abschwächung der Donor-T-Zellantwort gelegt, wie z.B. bei der Applikation des T-Zell depletierenden Antikörpers Alemtuzumab. Ein weiterer Ansatz zur Modulation von GvHD wäre eine Depletion oder Inaktivierung von differenzierten, aktivierten DC durch DC depletierende Agenzien.

Erste *in vitro* Untersuchungen sind mit dem Antikörper CMRF-44 gemacht worden, welcher an aktivierte DC bindet. Aus kultivierten PBMC konnten 89% der CD83 positiven Zellen depletiert werden, wobei das myeloide Kompartiment besonders gut lysiert wurde. Auch die Fähigkeit, allogene T-Lymphozyten zu stimulieren, war nach der Behandlung stark eingeschränkt [122].

Erste *in vivo* Untersuchungen wurden mit einem Anti-CD83 Antikörper durchgeführt. Dabei wurden PBMC i.p. appliziert. Die Tiere, welche zusätzlich den Anti-CD83 Antikörper erhalten hatten, bildeten eine signifikant gering gradigere GvHD aus. Somit spielen APC auch bei der Xeno-GvHD eine Rolle. In dem genannten Beispiel sind es jedoch die mitapplizierten Donor-APC, welche für die Ausbildung der GvHD verantwortlich sind. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine reine Applikation von humanen T-Zellen nur bei 1/3 der Tiere zur Entstehung einer GvHD führte und monozytengereifte DC eine GvHD bei den nicht erkrankten Tieren auszulösen vermochten [123].

Keiner der aufgeführten Ansätze berücksichtigt die elementare Rolle der allogenen gewebständigen Empfänger APC, da diese in den genannten Modellen fehlen. Eine echte Alloreaktivität wäre demnach nur bei T-Zellen möglich, welche eine Restriktion auf murines MHC aufweisen, da humanes HLA in diesen Tieren fehlt. Man kann also in diesen Modellen nur von einer Xeno-GvHD sprechen.

Ein *in vitro* GvHD-Modell, welches humane Haut als intaktes Gewebe verwendet, wurde von Wang et. al. publiziert [124]. In diesem Modell wurden Patientenproben (Blut und Hautbiopsien) vor HSCT von Spender und Empfänger entnommen. Bestrahlte PBMC des Empfängers und PBMC des Spenders wurden in einer MLR (engl.: *mixed lymphocyte reaction*) kokultiviert und eine Hautbiopsie des Patienten nach einer Woche zugefügt. Das Hautstück wurde nach drei Tagen Kulturzeit fixiert und histologisch auf Anzeichen einer GvHD untersucht. Das Modell berücksichtigt dabei nicht die klinisch angewendeten GvHD Prophylaxen, wie die T-Zelldepletion des Transplantats, die *in vivo* T-Zelldepletion des Wirts oder die dosisreduzierte Konditionierung. Dies war ein Grund, wieso die Vorhersage einer akuten GvHD nur bei den Patienten möglich war, welche eine konventionelle Transplantation durchliefen.

Xenotransplantate wurden bis heute nicht verwendet, um humane GvHD zu untersuchen. Erste *in vivo* Versuche wurden mit einer Keratinozytenzelllinie in Kombination mit einer dermalen Fibroblastenlinie durchgeführt [125, 126]. Dabei wurde eine Mischung dieser beiden Zelllinien subkutan in die Flanke von SCID Mäusen injiziert. Nach drei Wochen bildete sich eine epidermisartige Struktur aus. Wurden allogene PBMC zu der verwendeten Hautzellmischung gegeben, konnte eine dosisabhängige GvHD in der epidermisartigen Struktur induziert werden. Bei der Verwendung von autologen PBMC blieb eine solche entzündliche Reaktion aus. Auch die Applikation von isolierten CD4 oder CD8 positiven Lymphozyten verlief ohne Entzündungsnachweis. Wurden jedoch CD14 positive Monozyten bzw. ausgereifte DC zu einer Mischung von CD8 und CD4 positiven Lymphozyten gegeben, war eine Infiltration der epidermisartigen Struktur nachweisbar. Somit sind auch in diesem Modell die mitapplizierten Donor-APC für die Ausbildung einer GvHD verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Transplantationsmodell etabliert werden, welches es ermöglicht, die Entwicklung humaner Haut-GvHD mit Hilfe von Xenotransplantaten zu untersuchen. Dass durch Hauttransplantationen relevante

Aussagen gemacht werden können, wurde bereits in den verschiedenen Psoriasis-Modellen demonstriert. Bei der Entstehung von Haut-GvHD sollte nun die Rolle gewebständiger APC untersucht werden. Dies kann nur durch eine Transplantation von Gewebe geschehen. In dem für diese Arbeit etablierten Modell, wurde der Fokus auf die Interaktion von Empfänger-APC und Spender-T-Lymphozyten gelegt, welche maßgeblich am Pathomechanismus der GvHD beteiligt sind [89]. Vor Allem die Bedeutung von epidermalen LC sollte in diesem Kontext beleuchtet werden.

LC wurden nach ihrer Entdeckung zunächst den Nervenzellen zugeordnet [51]. Dies geschah aufgrund ihrer dendritischen Morphologie. Ihre Zugehörigkeit zu den APC wurde erst 1985 durch Schuler und Steinman propagiert [52]. Diese führten *in vitro* Untersuchungen mit LC als Stimulatoren von Lymphozyten durch und wiesen so auf ihre immunologische Bedeutung in der Epidermis hin. Das Empfänger-APC bei der Entstehung von GvHD eine entscheidende Rollen spielen, wird deutlich im Transplantationsmodell von Shlomchick et. al., in dem MHC-Klasse-1 positive Empfänger Zellen durch syngene MHC-Klasse-1 defiziente Spender APC ersetzt wurden und umgekehrt [90]. Auf diese Weise konnte nach einer zweiten allogenen Transplantation eine T-Zellaktivierung und eine Interaktion von Spender-T-Zellen mit Empfänger-APC verhindert werden wenn keine MHC-Klasse-1 Moleküle exprimiert wurden und eine GvHD blieb aus. Dies unterstreicht erneut die bedeutende Rolle der persistierenden Empfänger-APC bei der Entstehung von GvHD. Besonderheiten der LC in diesem Zusammenhang sind ihre Potenz, T-Zellen zu stimulieren [60] und ihre Strahlungsresistenz.

Im murinen Modell persistierten LC, im Gegensatz zu Monozyten oder DC, noch über Monate nach syngener Transplantation [93]. Das diese persistierenden LC Auslöser einer GvHD nach allogener Transplantation sein können, wurde in einem weiteren Transplantationsmodell gezeigt. Dabei wurde demonstriert, dass nur T-zellhaltiges Knochenmark von Tieren mit unterschiedlichem MHC zu einem schnellen Wechsel von Empfänger- zu Spender-LC führte. Im Gegensatz dazu wurden LC des Empfängers nicht ersetzt, wenn ein T-Zell depletiertes Knochenmark verwendet wurde. Eine weitere Transplantation von allogenen Knochenmark führte in genau diesen Tieren zur GvHD [93].

In der humanen HSCT wurde das Persistieren von Empfänger-LC bereits vor 15 Jahren beschrieben [127]. Neuere Studien bestätigen diesen verlangsamten Chimärismus. Der Wechsel von Spender- zu Empfänger-LC ist, verglichen mit

anderen DC-Subgruppen des peripheren Blutes, im Rahmen T-Zell depletierter HSCT verlangsamt [96, 97, 128]. Ein weiteres Modell, welches der HSCT sehr nahe kommt, wurde an Mäusen mit identischem MHC, jedoch verschiedenen minor-histokompatiblen Allelen getestet. In diesem Modell persistierten die LC des Empfängers in der Haut sowie Empfänger-DC in den SLO. Erst nach der Infusion von Donorlymphozyten wurden die DC von den Spenderzellen ersetzt [98]. Diese Studien deuten an, dass nicht nur die Anwesenheit von alloreaktiven T-Zellen, sondern auch deren Menge einen Einfluss auf den LC-Chimärismus hat. Zusätzlich scheinen alloreaktive T-Zellen persistierende Empfänger-LC zu depletieren, da akute GvHD die Entwicklung eines vollständigen Spender-LC-Chimärismus beschleunigt [129]. Eine Korrelation zwischen T-Zelldepletion und verzögertem Wechsel von Spender- zu Empfänger-LC nach HSCT wurde beim Menschen jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen. Ebenso fehlt der Nachweis, dass persistierende Empfänger LC für die Induktion von GvHD verantwortlich sind.

In dem in dieser Arbeit untersuchten Modell sollte es ermöglicht werden, Zellpopulationen der gesunden Haut und deren Wechselwirkung mit alloreaktiven T-Zellen zu studieren und entzündliche Prozesse zu simulieren. Verwendet wurde der NSG Stamm welcher sich, im Vergleich zu anderen immunsuprimierten Stämmen, wie z.B. dem reinen SCID-Stamm, durch eine verlängerte Lebensdauer auszeichnet [130]. Auch das Fehlen von funktionellen T-, B- und NK-Zellen durch den *knockout* des IL-2 Rezeptors macht eine unbeeinträchtigte Applikation von humanen Zellen möglich. Dadurch wäre man in der Lage diese Tiere mittels humanen Stammzellen zu rekonstituieren und ein humanisiertes Modell zu erschaffen. Auch toleriert dieser Stamm aufgrund der starken Immunsuppression ein xenogenes Hauttransplantat.

Zur Transplantation wurde postoperative Resthaut verwendet. Die Rekonstitution von LC in der Epidermis des Transplantats, aber auch die übertragene Leukozyteninfiltration im Transplantat war variabel. Dies war Abhängig von der Erkrankung oder Vorbehandlung des Hautspenders, einem Vorliegen von Infektion oder Gefäßerkrankungen bzw. Bestrahlung des Hautareals. In seltenen Fällen führte eine starke Leukozytenlast der transplantierten Haut zur spontanen Entzündung des Transplantats, was einen Ausschluss aus dem System zur Folge hatte.

Nicht zur Transplantation geeignet waren Narbenexzidate, da sie als kollagenreiches Ersatzgewebe nicht vital anwachsen. In der Folge konnte gesunde Haut aus

Mammareduktionsplastiken und Abdominalplastiken verwendet werden, was zu sehr gutem *Engraftment* führte. Insgesamt wurden für diese Arbeit 383 Tiere transplantiert und es konnte eine durchschnittliche *Engraftmentrate* von ca. 78% erreicht werden, wobei die Methodik eine wichtige Rolle spielte (Tab.7).

Methoden bekannter Psoriasismodelle wurden für das vorgestellte Modell optimiert und weiterentwickelt. Verwendet wurde Spalthaut sowie fett- und bindegewebsfreie Vollhaut. Das *Engraftment* beider Hautvorbereitungen war identisch. Grundsätzlich erfolgte die Positionierung der humanen Haut nach Boehncke et. al. [112]. Zusätzlich zur Fixierung durch Nahtmaterial, wurde für diese Arbeit eine Fixierung durch Gewebekleber (Tissucol) oder Sprühpflaster entwickelt. Dies machte es möglich, nur vier Fixierungspunkte mit Nahtmaterial zu setzen, was eine enorme Zeitersparnis zur Folge hatte. Der Schutz des Transplantates erfolgte durch paraffinierte Gaze und einen *Pouch*. Diese optimierte Umsetzung führte zu sehr guten Ergebnissen im Bezug auf das Anwachsen der Transplantate (*Engraftment* von bis zu 95% bei Verwendung von ausschließlich dieser Methode – vgl. Kapitel 3.2.).

In allen durchgeführten Experimenten führte die Xenotransplantation zu morphologischen und histologischen Veränderungen der Haut im Verlauf des Heilungsprozesses. Die Transplantate verkleinerten sich während des Heilungsprozesses im Durchmesser und bildeten eine Kruste, welche sich nach 3 bis 5 Wochen ablöste (Abb.7). Histologisch war eine Hyperparakeratose sichtbar, eine Kombination aus verstärkter (Hyperkeratose) und gestörter Verhornung (Parakeratose) des *stratum corneum*. Ebenso entwickelte sich Akanthose, welche sich durch ein verdicktes *stratum spinosum* auszeichnet (Abb.12). Diese Beobachtung konnte auch von anderen Gruppen gemacht werden, wobei die Ausbildung einer Akanthose nur vorübergehend zu sein schien [115, 131]. In einigen der durchgeführten Experimente konnte nach wenigen Wochen der Einheilung ein massives Lymphozyteninfiltrat in den Transplantaten festgestellt werden. In diesen Fällen trat eine stark veränderte Hautmorphologie auf (überdurchschnittliche Akanthose und Hyperparakeratose). In seltenen Fällen entzündete sich das Transplantat spontan. Dies trat nur bei postoperativer Resthaut auf, bei der eine entzündliche Erkrankung des Spenders vorlag. Ähnliche Beobachtungen wurden von Racki et. al. gemacht, deren Transplantate stärker pigmentiert, rau und verdickt erschienen, wenn sich eine starke Leukozytenlast in der transplantierten Haut befand. Mit dem Transplantat übertragene Leukozyten sollen den Heilungsprozess

beeinflussen und dabei spielt vor allem deren Menge eine wesentliche Rolle [132]. NK-Zellen sind, neben T-Zellen, maßgeblich am Prozess der Xenogewebeabstoßung beteiligt [133]. Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausstammes haben mittransplantierte Leukozyten die Möglichkeit im Transplantat zu perisitieren, da reaktive T- und NK-Zellen fehlen. In Entzündungs- und Heilungsprozessen spielen zudem Gr1-positive neutrophile Granulozyten des Empfängers, hier der NSG-Maus, ebenfalls eine wesentliche Rolle [134]. In einem Hauttransplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass durch Gabe eines Anti-Gr1 Antikörpers eine verbesserte Wundheilung von humaner Haut auf NSG-Mäusen und eine geringere histologische Veränderung des Transplantates erreicht werden konnte [132]. Eine Färbung gegen murine Gr1-positive neutrophile Granulozyten könnte in zukünftigen Versuchen durchgeführt werden. So könnte überprüft werden, ob auch in Transplantaten des von uns verwendeten Mausstammes Gr1-positive neutrophile Granulozyten vermehrt vorhanden sind. Ebenfalls kann eine Applikation von Gr1-Antikörper in Erwägung gezogen werden, um das Anwachsen und Ausheilen der Hauttransplantate zu verbessern.

Eine Beurteilung des Zustandes der transplantierten Haut im Vergleich mit dem von gesunder Haut ist wichtig. Zu diesem Zweck wäre eine immunhistologische Analyse der in der Epidermis lokalisierten Meprine möglich. Keratinozyten der Epidermis durchlaufen verschiedene Stadien auf ihrem Weg vom *Stratum basalis* zum *Stratum corneum* [135]. Meprin α wird von zylindrischen Keratinozyten mit großem Zellkern exprimiert, Meprin β hingegen ist in Zellen des *Stratum granulosum* zu finden. Die Morphologie ist hier, im Vergleich zum *Stratum corneum* stark verändert, denn ihr Zellkörper ist abgeflacht und ein Zellkern ist nicht mehr vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster dieser beiden Meprine in akanthotischer, hyperproliferierender Haut der Psoriasis verändert ist und stellt die besondere Rolle der Meprine bei der Keratinozytendifferenzierung heraus [136]. Meprine wären daher geeignete Marker, um den Zustand der Transplantate des vorgestellten Modells nach dem Prozess der Wundheilung zusätzlich zu beurteilen oder Unterschiede nach Applikation des Gr-1 Antikörpers darzustellen.

4.2. LC IM XENOTRANSPLANTATIONSMODELL

In dem für diese Arbeit etablierten Modellsystem wurde zunächst die Verteilung hämatopoetischer humaner Zellpopulationen im Prozess der Wundheilung des Transplantats untersucht. Im besonderen Fokus, neben dermalen DC, stand hierbei die epidermale LC Population. Dabei konnte gezeigt werden, dass Langerhanszellen in den ersten Wochen nach der Transplantation vorübergehend nicht mehr in den Hauttransplantaten nachweisbar waren (Abb.14). Zusätzlich zu den spezifischen Markern wurde eine HLA-DR Färbung durchgeführt. LC der Epidermis exprimieren HLA-DR nur auf der Plasmamembran ihrer Dendriten, nicht aber auf dem Zellkörper. Isolierte oder aktivierte LC hingegen, zeigen eine gleichmäßige, stark ausgeprägte Verteilung des Klasse-II-Moleküls, was darauf hindeutet, dass Isolation oder Aktivierung eine Hochregulation zur Folge hat [137]. HLA-DR stellt somit einen Marker dar, der je nach Aktivierungszustand unterschiedlich exprimiert wird und nicht ausschließlich zum Nachweis von LC verwendet werden kann. Da die Möglichkeit bestand, dass epidermale LC ihre Oberflächenmarker herunter regulieren und so nicht mehr detektierbar waren, wurden in allen Versuchen LC mit Hilfe der drei beschriebenen Marker (CD1a, CD207, HLA-DR) nachgewiesen. Alle drei verwendeten Marker waren am Tag der Transplantation in der Epidermis detektierbar, konnten jedoch in den ersten Wochen der Heilung nicht mehr angefärbt werden. Im Gegensatz dazu, waren CD11c positive Zellen zu allen Zeitpunkten permanent in der Dermis nachweisbar (Abb.14). Dabei handelt es sich um dermale APC, welche eine robuste Population darstellen, da sie weder durch Bestrahlung noch medikamentös vollständig aus dem Gewebe depletiert werden können. Untersuchungen mit bestrahlten knochenmarks-transplantierten Mäusen ergaben, dass dermale DC in der Dermis persistieren und lokal proliferieren [74]. Auch besitzen sie das Potential allogene T-Zellen durch Zytokinproduktion oder antigenvermittelt zu stimulieren. Die Rolle persistierender APC in der humanen Dermis wird auch deutlich durch das mit der Zeit sinkende Risiko einer GvHD nach DLI Gabe bei dosisreduzierten konditionierten Patienten [138]. Dabei spielt der Grad des Chimarismus eine wesentliche Rolle, welcher zu späteren Zeitpunkten nach Transplantation weiter vorangeschritten ist und so die DLI besser vertragen werden. Zusätzlich stellen CD11c positive zirkulierende Zellen eine Population dar, welche die Fähigkeit besitzt,

sich zu verschiedenen DC Populationen auszudifferenzieren [139]. Somit könnten auch hier lokale Vorläuferzellen vorhanden sein.

Im Zeitraum 6-9 Wochen nach Transplantation konnten LC erneut in der Epidermis nachgewiesen werden. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, dass die LC Dichte in den ersten Wochen nach Transplantation abnimmt, dann aber wieder Ausgangsniveau erreicht [140]. Auch stellen LC eine stabile Population in Xenotransplantaten dar, da sie über einen Zeitraum von 12 Monaten nachgewiesen werden konnten [131].

Der Mechanismus des temporären Verschwindens der LC bleibt weiterhin unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Zellen während der Heilung stimuliert werden, dadurch eine Aktivierung erfolgt und sie aus der Epidermis auswandern. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer durch den Prozess der Wundheilung ausgelösten Apoptose. Es könnten zukünftig weitere Marker, wie Caspase 9, CXCR4 oder CCR7 gefärbt oder ein TUNNEL-Assay durchgeführt werden, um dieses Phänomen zu untersuchen. Caspasen, wie Caspase 9, sind intrazelluläre Proteasen, welche als Initiatoren und Effektoren der Apoptose dienen [141]. CXCR4 stellt einen wichtigen Mediator für das Auswandern der LC aus der Epidermis in die Dermis und CCR7 zu den Lymphknoten dar [142, 143]. Dabei kommt vor allem den Zytokinen TNF α und IL1 β eine wichtige Rolle zu [144]. LC selbst produzieren bei Stimulation durch Haptene IL1 β und Keratinozyten oder Fibroblasten TNF α [145]. Über eine solche Ausschüttung von Zytokinen wäre eine Aktivierung der LC möglich und ihr Auswandern könnte angeregt werden. Da die Milz als SLO ein Ort der Antigenpräsentation ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PCR mit der DNA isolierter Milzzellen aus transplantierten Tieren durchgeführt. Bei dieser Untersuchung mit spezifischen Primern für eine α -Satelitensequenz des humanen Chromosom 17 [110], konnte keine humane DNA vervielfältigt werden (Abb.13). Auch das Auswandern der humanen LC in die das Transplantat umgebende murine Haut, sowie Einwandern von murinen LC in das humane Gewebe konnte nicht festgestellt werden. Dieses Phänomen wurde auch durch frühere Untersuchungen bestätigt, in welchen Haut unterschiedlicher Spezies auf Mäuse des athymischen *nude* Stammes transplantiert wurden. Murine LC wurden mit einem speziesspezifischen Antikörper markiert und deren Einwandern in das Xenotransplantat untersucht. In transplantierte Rattenhaut konnten sie jedoch detektiert werden, waren aber nicht in humanen und meerschweinchenstämmigen

Hauttransplantaten nachweisbar. Somit wurde gezeigt, dass humane Hauttransplantate nicht von murinen LC infiltriert werden [146]. Auch konnten keine humanen LC in muriner Epidermis nachgewiesen werden [140]. Eine weitere Möglichkeit für das Auswandern der LC, stellt die Kombination von Migration und Apoptose dar. Einzelne Zellen wandern aus und sterben während der Migration in Richtung lymphatischer Gefäße ab.

Dass LC wenige Tage nach Transplantation nicht mehr nachweisbar waren, sie aber nach Wochen wieder detektiert werden konnten, erforderte weitere bestätigende Untersuchungen. Da die Tiere keine humane Blutbildung besitzen, stellt sich die Frage, woher potentielle Vorläuferzellen für LC kommen, da eine Rekrutierung aus dem peripheren Blut in das Gewebe ausgeschlossen werden kann. Bislang wurde angenommen, dass es eine knochenmarksstämmige Vorläuferzelle gibt [147, 148]. Neue Studien konnten in einem chimären Mausmodell zeigen, dass Gr-1 positive Monozyten in LC defizientes Gewebe einwandern, dort lokal proliferieren und sich zu LC entwickeln [65]. *In vitro* konnte dies auch für zirkulierende und persistierende dermale Monozyten gezeigt werden [149, 150]. Auch wurden zirkulierende CD11c positive Zellen, neben den Monozyten, als Vorläufer aller DC Populationen *in vivo* identifiziert [139]. Somit ist das Vorhandensein einer lokalen Vorläuferzelle der LC sehr wahrscheinlich.

Um zu überprüfen, ob in Transplantaten, in denen die LC verschwunden waren, eine Repopulation stattfindet, wurden zu definierten Zeitpunkten Biopsien des Transplantats genommen und mittels sequentiellen Schnittfolgen untersucht [151]. Das restliche Transplantat wurde einige Wochen später aufgearbeitet und ebenfalls sequentiell untersucht. Vergleicht man nun den frühen Zeitpunkt (Biopsie) und den späten (Versuchsende), konnten variable Verläufe beobachtet werden:

- 1) Transplantate, die sowohl zum Zeitpunkt der Biopsie als auch am Versuchsende LC aufwiesen,
 - 2) LC defiziente Biopsien und LC defiziente Versuchsenden,
 - 3) Biopsien mit LC aber LC defiziente Versuchsenden,
 - 4) Transplantate deren Biopsie LC defizient aber das Versuchsende LC positiv war.
- Bei einigen Transplantaten (hier: Punkt 4) konnte der Verlust der LC und eine spätere Repopulation nachgewiesen werden und somit der formale Beweis, dass LC in individuellen Transplantaten zurückkehren können. Aufgrund fehlender humaner Hämatopoese, weisen diese Daten auf einen lokalen Vorläufer in der Haut hin.

Weitere Studien deuten an, dass diese Vorläufer in Haarfolikeln lokalisiert sein könnten [152]. Dazu passt der Befund einer Studie aus den 60er Jahren. Hier wurde Haut unterschiedlicher Herkunft untersucht und die größte Dichte an LC in der Haut des Abdomens, der Kopfhaut und der Fußsohle gefunden. Dabei gab es einen signifikanten Unterschied in der Dichte der LC zwischen behaarter und unbehaarter Haut, wobei die behaarte Haut die größere Dichte aufwies [153]. Diese Ergebnisse deuten auf einen entscheidenden Anteil der Haarfolikel im Prozess der LC Rekonstitution hin. Die Hautquelle scheint somit ein wichtiger Faktor für das erfolgreiche Etablieren LC positiver Transplantate zu sein.

LC besitzen die einzigartige Fähigkeit der Proliferation *in situ*. Diese proliferative Kapazität wurde mit Hilfe von BrdU Färbungen an humanen [68] und murinen LC gezeigt [66].

Die proliferative Aktivität von in Xenotransplantaten enthaltenen LC konnte mittels Ki67 nachgewiesen werden [151]. Dabei wurde gezeigt, dass mehr als 30% der rekonstituierenden LC proliferierten. Im Vergleich dazu besitzt gesunde Haut lediglich 5% dieser proliferierenden Zellen [154]. Dies konnte auch von Chorro et. al. in muriner Haut gezeigt werden [155]. Diese Daten sprechen dafür, dass auch die Proliferation der LC eine wichtige Rolle bei der Repopulation der Epidermis spielt. Die Existenz von epidermisständigen LC-Vorläufern, welche eine Repopulation möglich machen, wird weiterhin diskutiert. Unsere Daten lassen sich mit Daten der murinen LC Biologie vergleichen, welche zeigen, dass die LC selbst die Quelle der lokalen Rekonstitution sein können [66, 68].

Um gezielt LC defiziente und LC positive Hauttransplantate aus einem System zu erhalten, wurde untersucht, ob es möglich ist, LC durch Bestrahlung zu depletieren. Bestrahlung mit unterschiedlichen Wellenlängen ergaben im murinen System, dass LC vorzugsweise mit niedrigen Wellenlängen (UVC oder UVB Spektrum, 200 mJ/cm²) depletiert werden können. Dies geschah aber nicht vollständig, denn es verblieben Zellen in der Epidermis, welche die Expression des Markers CD1a lediglich herunter regulieren [156]. Eine Vergrößerung der Zelloberfläche der LC konnte zusätzlich festgestellt werden. Weitere Untersuchungen wurden mit höheren Dosen (bis 1J/cm²) durchgeführt. Auch hier war nur eine vorübergehende Depletion und eine Regulation der Oberflächenmarker feststellbar [147]. Der Gebrauch von Gamma-Strahlung führte ebenfalls nicht zur vollständigen Depletion der LC

Population. Untersuchungen der 80er Jahren belegen eine LC Depletion aus humaner Haut für UVC-Strahlung [157].

Im Xenotransplantationsmodell fehlt eine humane Hämatopoese, so sollte eine Depletion durch UVC permanent sein. Für diese Versuche, mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell, wurden humane Hautstücke vor der Transplantation mit UVC bestrahlt (30min, 15Watt, im Abstand von 38cm). Zusätzlich wurde eine Hautkultur angelegt um die Epidermis und ausgewanderte Zellen im Überstand zu untersuchen (Abb.15). Innerhalb von einer Woche war in den bestrahlten Proben eine deutliche Reduktion der LC Dichte nachweisbar (Abb.17). Untersuchte man transplantierte Haut nach 5 Wochen, konnte bei den bestrahlten Proben eine um 10% erhöhte LC Rekonstitution von LC in den Transplantaten festgestellt werden (Abb.19). Eine verstärkte Proliferation war jedoch nicht detektierbar.

Die Reduktion der LC in den kultivierten Hautproben spricht für ein Auswandern der Zellen. Bis zu 5% vitale HLA-DR positive Zellen konnten im Überstand nachgewiesen werden (Abb.18). Untersuchungen von humaner Haut nach UVB-Exposition, zeigte eine Reduktion der LC Dichte [158]. Diese beruhte auf der Migration vitaler aber geschädigter LC aus der Epidermis, welche in der Wundflüssigkeit von vakuum erzeugten Hautblasen isoliert werden konnten. Vereinzelt konnten auch Apoptosen festgestellt werden.

Mit transplantierte Haut auf dem *nude*-Stamm wurden von Krueger et. al. bereits erste Versuche der LC Depletion durchgeführt. Sie verglichen die Applikation von UVB-Strahlung, Steroiden oder „*tape-stripping*“ (Abziehen von Klebeband) nach Transplantation und die Applikation von Gamma-Strahlung, Anti-CD1a Antikörpern oder toxingekoppelte Antikörper vor Transplantation. UV-Strahlung und Steroide waren vorübergehend in der Lage LC zu reduzieren, jedoch war die ursprüngliche Menge an LC nach 3 Wochen erneut messbar. Gamma-Strahlung, „*tape-stripping*“ und die Applikation von Antikörpern blieb ohne Effekt [159]. Diese Untersuchungen belegen den robusten Charakter dieser Population und lassen auch hier einen Hinweis auf eine Vorläuferzelle erkennen. Der Effekt der erhöhten LC Repopulation nach Transplantation bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Beobachtung im Rahmen der Langerhanszellrekonstitution ist das Auftreten von neugebildeten LC in *clustern*. Dieses gruppenweise Auftreten von LC konnte bereits in murinen Modellsystemen gezeigt werden [65, 67]. Sollte dies auch für humane Haut gültig sein, tritt eine methodenbedingte Schwierigkeit auf.

Angefertigte Schnitte, auch wenn sie sequentiell durchgeführt werden, können nur einen kleinen Bereich des Transplantats widerspiegeln. Auch ist diese Methode sehr aufwendig und zeitintensiv. Um diesen Zeitaufwand zu verringern, könnte zukünftig die Methode der Anfertigung eines *epidermal sheet* durchgeführt werden. Dabei wird die Epidermis des Transplantats abgelöst, fixiert und LC mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Eine Auswertung erfolgt über die gesamte Oberfläche des *sheet*s. So wäre ein Überblick über die gesamte untersuchte Epidermis durchführbar und *cluster* könnten leicht identifiziert werden. Mit dieser Methode ist allerdings keine Aussage über die Dermis möglich, da diese bei der Präparation entfernt wird.

4.3. LC ALS ZIELZELLEN DER GVHD

LC sind eine robuste Population, die sich nicht ohne Weiteres aus der Epidermis depletieren lassen. Eine Depletion konnte erst durch allogene T-Zellen und UVC-Bestrahlung nach allogener Knochenmarkstransplantation erreicht werden [93]. Diese und die eigenen Ergebnisse unterstreichen den robusten Charakter der LC.

Der Einfluss allogener T-Zellen auf die LC Population, kann in dem vorgestellten Modellsystem untersucht werden. Des Weiteren kann geprüft werden, ob es möglich ist, eine GvHD artige Entzündung in den Transplantaten zu induzieren.

Zu diesem Zweck wurden DC des Hautspenders generiert und damit HLA-disparate T-Zellen *in vitro* stimuliert. Auf diese Weise sollte eine maximale Alloreaktivität gegen das Hauttransplantat generiert werden. In allen vorgestellten Systemen ließ sich nach Infusion der T-Lymphozyten eine T-Zellinduzierte, inflammatorische Reaktion auslösen. Optisch war eine deutliche Rötung nach wenigen Tagen sichtbar. Diese war jedoch nur in den Proben besonders deutlich, welche T-Zellen mit vorheriger *in vitro* Stimulation durch DC des Hautspenders erhalten hatten. Histologisch konnten Anzeichen einer Entzündung nachgewiesen werden. Neben Akanthose und Hyperparakeratose, waren deutliche T-Zellinfiltrate detektierbar. Auch Spaltbildung und Ablösung der Epidermis, sowie vereinzelte Apoptosen der epidermalen Zellen weisen auf eine GvHD artige Entzündung hin (Abb.24).

Eine weitere Beobachtung nach T-Zellgabe war die Depletion der LC aus der Epidermis. LC stellen somit das primäre Ziel der alloreaktiven T-Zellen dar. Eine spätere, höhere T-Zellgabe konnte keine weitere Hautrötung auslösen, was diese Funktion als Zielzelle unterstreicht.

Die Induktion von GvHD *in vivo* ist abhängig von der Aktivierung der Spender T-Zellen in den SLO. Dies konnte gezeigt werden, indem eine Blockade von Homing-Rezeptoren der T-Zellen zu den SLO die murine GVHD verhinderte [160]. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell erlaubt die Untersuchung von *in vitro* generierten alloreaktiven T-Zellen und deren Einfluss auf hautständige DC. Ein *homing* von T-Zellen in SLO ist in diesem Modell nicht möglich, da dem NSG-Stamm eigenes lymphatisches Gewebe fehlt. Humane APC, welche von T-Zellen erkannt werden könnten, befinden sich nur im Transplantat. Aus diesem Grund ist ein Vorstimulieren der T-Zellen notwendig. So kann nur der efferente Arm der GvHD untersucht werden. Diese Lücke könnte durch die Verwendung von humanisierten Tieren geschlossen werden. Dabei werden NSG-Tiere bestrahlt und humane Stammzellen appliziert. Es entwickelt sich humane Hämatopoese, wobei es sogar bei postnataler Injektion möglich ist, eine Ausbildung von Thymus und Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen zu erreichen [161]. Allerdings wäre es für das vorgestellte Modell nötig, Stammzellen und Haut ein und desselben Spenders zu verwenden, denn bei allogener Transplantation wäre eine Abstoßungsreaktion zu erwarten.

Durch die Dosissteigerung bei der T-Zellapplikation im Versuchsverlauf, sollte die Dosisabhängigkeit ermittelt werden. Ebenso sollte eine störende Xeno-GvHD vermieden werden. Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, bereits mit einer geringen Anzahl allogener vorstimulierter T-Zellen, eine sichtbare Hautrötung auszulösen (System S108).

Histologische Zeichen der Entzündung waren nur in der Gruppe der Tiere zu finden, die vorstimulierte Zellen erhalten hatten. Histologisch waren hier in der Epidermis Spaltbildung und T-Zellinfiltrate nachweisbar (Abb.27, Abb.32). Der semiquantitativen Analyse der T-Zellinfiltrate ist zu entnehmen, dass die stärkste Infiltration in den Transplantaten stattgefunden hat, welche die *in vitro* generierte MLDC erhalten hatten (Abb.32). Die Infiltration war hier, verglichen mit den unstimulierten CD8 T-Zellen, signifikant verstärkt.

Ein Vergleich mit der Kontrolle konnte nach Applikation von unstimulierten CD8 positiven T-Zellen eine Reduktion der Menge an LC in der Epidermis festgestellt werden. Nach Applikation von *in vitro* generierten MLDC waren keine LC mehr nachweisbar. Im Gegensatz zu den LC, die im Rahmen der T-Zellinfiltration aus der Epidermis depletiert wurden, konnten HLA-DR positive DC weiterhin in der Dermis nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wird gestützt von Haniffa et. al.; Sie

konnten durch Chimärismusuntersuchungen an dosisreduziert konditionierten Patientenproben zeigen, dass der Prozess der GvHD einen signifikanten Effekt auf den Wechsel von Empfänger- zu Spender-LC hat. Persistierende Empfänger-LC wurden schneller von Spenderzellen ersetzt, wenn eine GvHD vorlag. Bei einer vollen Konditionierung des Patienten war dieser Unterschied nicht sichtbar, da hier nur wenige Empfängerzellen perisitierten [129].

Die induzierte Entzündung im vorgestellten Modellsystem scheint von der Anwesenheit von LC abhängig zu sein. Diese Abhängigkeit wurde deutlich, wenn Haut verwendet wurde, welche durch Vorbehandlung des Hautspenders LC defizient war (System S208). In diesem Kontext wurden massive T-Zellinfiltrate festgestellt, jedoch keine Rötung oder weitere histologische Anzeichen einer GvHD gefunden. Dies wird von der Aussage gestützt, dass LC Mediatoren der Haut GvHD sind und der Alloreaktivität unterliegen [129].

Ob LC zukünftig auch in einem HLA-identen System, welches stärker der klinischen Anwendung entspricht notwendig sind, um eine GVHD auszulösen, muss noch demonstriert werden. Herauszustellen ist, dass das für diese Arbeit entwickelte Modell verwendet werden kann, um den efferenten Arm der GVHD zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen der Haut, wie z.B. die Langerhanszellen (LC) der Epidermis, sind potente antigenpräsentierende Zellen (APC). Nach allogener Blutstammzelltransplantation (engl.: *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) persistieren Empfänger-APC und können Spender-T-Zellen aktivieren. Somit spielen dendritische Zellen eine kritische Rolle bei der Initiierung von akuter Transplantat-Gegen-Wirt-Reaktion (engl.: *graft-versus-host-disease*, GvHD).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem entwickelt, welches humane Haut in einem Xenotransplantationsmodell nutzt, um die Wechselwirkung dieser gewebständigen APC mit alloreaktiven T-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden humane Resthautpräparate von subkutanem Gewebe befreit und intraskaptil auf immunsupprimierte NOD/LtSz-scid IL2R γ -null Mäuse (NSG) transplantiert. Diesen Tieren fehlen funktionale T-, B- und NK-Zellen, und sie tolerieren somit ein xenogenes Transplantat. Im Vergleich zu anderen immundefizienten Stämmen, haben sie eine erhöhte Lebenserwartung und es ist zudem möglich humane Hämatopoese durch Stammzellgabe zu etablieren.

Publizierte Methoden der Hauttransplantation wurden für diese Arbeit optimiert und weiterentwickelt. So konnte die Erfolgsrate von 44% auf bis zu 95% gesteigert werden. Erste Untersuchungen fokussierten den Einfluss der Wundheilung auf die Verteilung dermalen Zellpopulationen, wie z.B. CD11c positive APC, und die Population der LC in der Epidermis. Während der ersten Wochen der Wundheilung war ein vorübergehendes Verschwinden der LC aus der Epidermis zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren CD11c positive dermale Zellen permanent detektierbar. Die zu späteren Zeitpunkten festgestellte Repopulation der Epidermis mit LC unterstützt die Hypothese einer lokalen Vorläuferzelle. Die vorgelegten Daten und die lokale proliferative Aktivität dieser Zellen unterstreichen ihre Unabhängigkeit vom peripheren Blut. Versuche, eine Depletion der LC mittels UVC-Bestrahlung zu erreichen, gelangen nicht. Auch dies spricht für das Vorhandensein eines lokalen Vorläufers.

Zur Induktion von GvHD in der transplantierten Haut wurden *in vitro* DC des Hautspenders generiert und damit HLA-disparate T-Zellen stimuliert. Auf diese Weise sollte eine maximale Alloreaktivität gegen das Hauttransplantat generiert werden. In allen vorgestellten Systemen ließ sich nach Infusion der T-Lymphozyten

in transplantierte Tiere, eine T-Zellinduzierte inflammatorische Reaktion auslösen. Optisch war eine deutliche Rötung des Transplantats feststellbar. Diese war jedoch nur in den Proben besonders deutlich, welche T-Zellen mit vorheriger *in vitro* Stimulation durch DC des Hautspenders erhalten hatten. Histologisch konnten Anzeichen einer Entzündung nachgewiesen werden. Neben Akanthose und Hyperparakeratose, waren deutliche T-Zellinfiltrate detektierbar. Auch Spaltbildung und Ablösung der Epidermis, sowie vereinzelte Apoptosen der epidermalen Zellen wiesen auf eine GvHD artige Entzündung hin.

Eine weitere Beobachtung nach T-Zellgabe, war die Depletion der LC aus der Epidermis. Auch konnte durch spätere T-Zellgaben keine weitere Hautrötung ausgelöst werden. Dies belegt die Funktion der LC als primäre Zielzelle der alloreaktiven T-Zellen. Unterstrichen wird dies durch Verwendung einer LC defizienten Haut, welche keine Hautrötung oder Anzeichen einer Entzündung entwickelte.

Zusammenfassend wurde für diese Arbeit ein Modellsystem entwickelt, welches es erlaubt Untersuchungen entzündlicher Hautkrankheiten unter Berücksichtigung hautständiger APC durchzuführen. Dabei kann dieses Modell in Zukunft für die Untersuchung von APC modulierenden Agenzien genutzt werden, da präklinische Modelle für spezies-spezifische Therapien bislang fehlten. Das Entstehen einer Entzündung könnte so verhindert oder eine Behandlung ermöglicht werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-1789
2. Delves, P. and I. Roitt, *The immune system - First of two parts*. New England journal of medicine, 2000. **343**: p. 37-49.
3. Delves, P. and I. Roitt, *The Immune System - Second of Two Parts*. New England journal of medicine, 2000. **343**: p. 108-117.
4. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Seminars in immunology, 2004. **16**(1): p. 3-9.
5. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nature Immunology, 2010. **11**: p. 373-384.
6. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**: p. 889-899.
7. Rammensee, H., *Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules*. Current opinion in immunology, 1995. **7**: p. 85-96
8. Klein, J. and A. Sato, *The HLA System - First of two parts*. New England journal of medicine, 2000. **343**: p. 702-709.
9. Klein, J. and A. Sato, *The HLA System - Second of two parts*. New England journal of medicine, 2000. **343**: p. 782-786.
10. Li, X. and M. Raghavan, *Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens*. Current Opinion in Organ Transplantation, 2010. **15**(4): p. 499-504.
11. Murphy, K., et al., *Immunobiology Book*, 2008: p. 928.
12. O'Callaghan, C. and J. Bell, *Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G*. Immunological reviews, 1998. **163**(1): p. 129-138.
13. Geraghty, D., *Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes*. Current opinion in immunology, 1993. **5**(1): p. 3-7.
14. Clark, R., R. Chong, and N. Mirchandani, *The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin*. The Journal of Immunology, 2006. **176**: p. 4431-4439.
15. Constant, S. and K. Bottomly, *INDUCTION OF TH1 AND TH2 CD4+ T CELL RESPONSES: The Alternative Approaches*. Annual Review of Immunology, 1997. **15**: p. 297-322.
16. Sigal, L., S. Crotty, and R. Andino, *Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen*. Nature, 1999. **398**: p. 77-80.
17. Hayday, A., *$\gamma\delta$ Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection*. Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 975-1026.
18. Spada, F., E. Grant, and P. Peters, *Self-Recognition of Cd1 by $\gamma\delta$ T Cells Implications for Innate Immunity*. The Journal of exp. med., 2000. **191**(6): p. 937-948.
19. Workalemahu, G. and M. Foerster, *Human $\gamma\delta$ -T Lymphocytes Express and Synthesize Connective Tissue Growth Factor: Effect of IL-15 and TGF- β 1*

- and Comparison with $\alpha\beta$ -T Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2003. **170**: p. 153-157.
20. Sandby-Mølller, J., T. Poulsen, and H. Wulf, *Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits*. Acta dermato-venereologica, 2003. **83**(6): p. 410-3.
 21. Welsch, U. and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 2003(2003): p. 676.
 22. Lotze, T. and W. Thomson, *Dendritic cells: biology and clinical applications*. Book, 2001: p. 794.
 23. Bos, J., *The skin immune system: progress in cutaneous biology*. Immunol. Today, 2002. **14**(2): p. 75-78.
 24. Dupasquier, M. and P. Stoitzner, *Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **123**: p. 876–879.
 25. Valladeau, J., *Cutaneous dendritic cells*. Seminars in immunology, 2005. **17**(4): p. 273-283.
 26. Stingl, G., et al., *Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors*. nature, 1977. **268**: p. 245 - 246.
 27. Figdor, C., Y. van Kooyk, and G. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**: p. 77-84.
 28. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. Immunological Reviews, 2005. **207**: p. 166–183.
 29. Austyn, J., *New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(4): p. 1287-92.
 30. Banchereau, J., *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998(392): p. 245-252
 31. Steinman, R., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annual review of immunology, 1991. **9**: p. 271-296.
 32. Hart, D., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-3287.
 33. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunology today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
 34. Morelli, A., J. Rubin, and G. Erdos, *CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2005. **175**: p. 7905-7915.
 35. Mantovani, A. and F. Bussolino, *Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside*. Immunology today, 1997. **18**(5): p. 231-235.
 36. Hedrick, J., *Chemokines and lymphocyte biology*. Current opinion in immunology, 1996. **8**(3): p. 343-347
 37. Rollins, B., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-928
 38. Yanagihara, S., E. Komura, and J. Nagafune, *EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation*. The Journal of Immunology, 1998. **161**: p. 3096-3102.
 39. Sallusto, F., *Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(4): p. 611-614.
 40. Sallusto, F., B. Palermo, and D. Lenig, *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. European journal of immunology, 1999. **29**(5): p. 1617–1625.

41. Rescigno, M., C. Winzler, and D. Delia, *Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response*. J Leukoc Biol. , 1997. **61**(4): p. 415-21.
42. Dhodapkar, M. and R. Steinman, *Antigen-Specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2001. **193**(2): p. 233.
43. Jonuleit, H., E. Schmitt, and G. Schuler, *Induction of Interleukin 10–Producing, Nonproliferating Cd4+ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells* The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(9): p. 1213-1222
44. Hackstein, H. and A. Morelli, *Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles*. Trends in immunology, 2001. **22**(8): p. 437-442
45. Winzler, C., P. Rovere, and M. Rescigno, *Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor–dependent Long-Term Cultures*. JEM, 1997. **185**(2): p. 317-328.
46. Steinman, R., *Myeloid dendritic cells*. Journal of leukocyte biology, 1999. **66**(2): p. 205-208.
47. McKenna, K. and A. Beignon, *Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity*. Journal of virology, 2005. **79**: p. 17-27.
48. Liu, Y., *IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors*. Immunology, 2005. **23**: p. 275-306.
49. Shortman, K., *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**: p. 151-161.
50. Romani, N., *Langerhans cells dendritic cells of the epidermis*. APMIS, 2003. **111**(7-8): p. 725-740.
51. Langerhans, P., *Über die Nerven der menschlichen Haut*. Virchows Archiv, 1968. **44**: p. 325-337.
52. Schuler, G., *Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro*. The Journal of Experimental Medicine, 1985. **161**(3): p. 526-546
53. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(12): p. 935-947
54. Birbeck, M., A. Breathnach, and J. Overall, *An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cell) in vitiligo*. J Invest Dermatol 1961. **37**: p. 51–64.
55. Wolff, K., *The fine structure of the Langerhans cell granule*. The Journal of cell biology, 1967. **35**(2): p. 468–473.
56. Mc Dermott, R., U. Ziylan, and D. Spohner, *Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(1): p. 317-335.
57. Stössel, H., et al., *Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells*. JEM, 1990. **172**(5): p. 1471-1482.
58. Gavino, A., J. Chung, and K. Sato, *Identification and expression profiling of a human C-type lectin, structurally homologous to mouse dectin-2*. Experimental 2005. **184**(2): p. 157-64.
59. Pena-Cruz, V., S. Ito, and C. Dascher, *Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells*. Journal of Investigative Dermatology, 2003. **121**: p. 517–521.

60. Bjercke, S., J. Elgø, and L. Braathen, *Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cells*. Journal of Investigative Dermatology, 1984. **83**(Dermatology): p. 286–289.
61. Katz, S. and K. Tamaki, *Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow*. Nature, 1979. **282**: p. 324 - 326.
62. Freilinger, J., et al., *Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin*. Nature Immunology, 1979. **282**: p. 321-323.
63. Jakob, T. and J. Ring, *Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001. **108**(5): p. 688-696.
64. Kissenpfennig, A., et al., *Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo:: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 643-654
65. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nature Immunology, 2006. **7**: p. 265 - 273.
66. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nature Immunology, 2002. **3**: p. 1135 - 1141.
67. Mende, I., H. Karsunky, and I. Weissman, *Flk2+ myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1383-1390.
68. Czernielewski, J., *Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1987. **88**: p. 17–20.
69. Allan, R., et al., *Epidermal Viral Immunity Induced by CD8α+ Dendritic Cells But Not by Langerhans Cells*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1925-1928
70. Belz, G., C. Smith, and D. Eichner, *Cutting Edge: Conventional CD8α+ Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming CTL Immunity to Viruses*. The Journal of Immunology, 2004. **172**: p. 1996-2000.
71. Nestle, F., X. Zheng, and C. Thompson, *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets*. The Journal of Immunology, 1993. **151**(11): p. 6535-6545
72. Lenz, A., M. Heine, and G. Schuler, *Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization*. Journal of Clinical Investigation, 1993. **92**(6): p. 2587–2596.
73. Geijtenbeek, T., R. Torensma, and S. van Vliet, *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. Cell, 2000. **100**(5): p. 575-585
74. Bogunovic, M., F. Ginhoux, and A. Wagers, *Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men*. The Journal of Experimental Medicine 2006. **203**(12): p. 2627-2638
75. Angel, C., E. George, and A. Brooks, *Cutting Edge: CD1a+ Antigen-Presenting Cells in Human Dermis Respond Rapidly to CCR7 Ligands*. The Journal of Immunology, 2006. **176**: p. 5730-5734.
76. Klechevsky, E., *Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD 14+ Dermal Dendritic Cells*. Immunity, 2009. **29**(3): p. 497-510.
77. Ginhoux, F., M. Collin, and M. Bogunovic, *Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(13): p. 3133-3146.
78. Bursch, L., et al., *Identification of a novel population of Langerin + dendritic cells*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204** (13): p. 3147-3156.

79. Wong, R., S. Giralt, and T. Martin, *Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years* Blood, 2003. **102**(8): p. 3052-3059.
80. Kolb, H., et al., *Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras*. Blood, 2004. **103**: p. 767-776.
81. Bolaños-Meade, J. and G. Vogelsang, *Novel strategies for steroid-refractory acute graft-versus-host disease*. Current Opinion in Hematology, 2005. **12**(1): p. 40-44.
82. Billingham, R., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lectures, 1966. **62**: p. 21-78.
83. Thomas, E. and F. A., *Graft-versus-host disease*. New England journal of medicine, 1979. **301**: p. 556.
84. Lau, A., *Dendritic cells and immune regulation in the liver*. Gut, 2003. **52**: p. 307-314.
85. MacDonald, T., *Immunity, inflammation, and allergy in the gut*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1920-1925
86. Woywodt, A., M. Haubitz, and S. Buchholz, *Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplantation, 2004. **34**: p. 1015–1023.
87. Lever, R., M. Turbitt, and R. Mackie, *A prospective study of the histological changes in the skin in patients receiving bone marrow transplants*. British Journal of Dermatology, 1986. **114**(2): p. 161–170.
88. Osawa, J., et al., *Immunohistochemical study of graft-versus-host reaction (GVHR)-type drug eruptions*. Journal of Dermatology, 1994. **21**(1): p. 25-30.
89. Ferrara, J., et al., *Graft-versus-host disease*. The Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-1561
90. Shlomchik, W., et al., *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells*. Science, 1999. **285**(5426): p. 412-415
91. Chakraverty, R., et al., *Host MHC class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions* Blood, 2006. **108**(6): p. 2106-2113.
92. Beilhack, A., S. Schulz, and J. Baker, *In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1113-1122.
93. Merad, M., P. Hoffmann, and E. Ranheim, *Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease*. Nature medicine, 2004. **10**: p. 510 - 517.
94. Duffner, U., Y. Maeda, and K. Cooke, *Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease*. The Journal of Immunology, 2004. **172**: p. 7393-7398.
95. Sprent, J., et al., *Functions of Purified L3T4+ and Lyt-2+ Cells in vitro and in vivo*. Immunological Reviews, 1986. **91**(1): p. 195–218.
96. Collin, M., *The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(1): p. 27-33
97. Auffermann-Gretzinger, S., et al., *Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Transplantation, 2006. **81**(6): p. 866.
98. Durakovic, N., K. Bezak, and M. Skarica, *Host-Derived Langerhans Cells Persist after MHC-Matched Allografting Independent of Donor T Cells and*

- Critically Influence the Alloresponses Mediated by Donor Lymphocyte Infusions.* The Journal of Immunology, 2006. **177**: p. 4414-4425.
99. Herr, W., et al., *The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor [alpha] spots in response to peptide antigens.* Journal of Immunological Methods, 1997. **203**(2): p. 141-152.
 100. Klein, E., et al., *Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid.* Int.J.Cancer, 1976. **18**: p. 421-431.
 101. Kaplan, J. and D. Callewaert, *Expression of human T-lymphocyte antigens by natural killer cells.* J.Natl.Cancer Inst., 1978. **60**: p. 961-964.
 102. Britten, C., et al., *The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T-lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays.* J.Immunol.Methods, 2002. **259**: p. 95-110.
 103. Kataoka, S., et al., *Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity.* Diabetes, 1983. **32**(3): p. 247-253
 104. Bosma, G., R. Custer, and M. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse.* Nature Immunology, 1983. **301**: p. 527 - 530.
 105. Dorshkind, K., G. Keller, and R. Phillips, *Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease.* The Journal of Immunology, 1984. **132**(4): p. 1804-1808.
 106. Shultz, L. and P. Schweitzer, *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice.* The Journal of Immunology, 1995. **154**: p. 180-191.
 107. Shultz, L., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R {gamma} null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.* The Journal of Immunology, 2005. **174**(10): p. 6477
 108. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur.* Vol. 5. 2002: Spektrum Akademischer Verlag. 352.
 109. Dauer, M., et al., *Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors 1.* The Journal of Immunology, 2003. **170**(8): p. 4069-4076
 110. Becker, M., et al., *Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems.* British journal of cancer, 2002. **87**(11): p. 1328-1335.
 111. Hoffman, R. and P. Kung, *Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood.* PNAS, 1980. **77**(8): p. 4914-4917
 112. Boehncke, W., *The SCID-hu xenogeneic transplantation model: complex but telling* Archives of Dermatological Research, 1999. **291**(7-8): p. 367-373.
 113. Gudjonsson, J., A. Johnston, and M. Dyson, *Mouse models of psoriasis.* Journal of Investigative Dermatology 2007. **127**: p. 1292-1308.
 114. Meyerrose, T., et al., *Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells.* Biotechniques, 2003. **35**(6): p. 1262-72.
 115. Krueger, G., D. Manning, and J. Malouf, *Long-term maintenance of psoriatic human skin on congenitally athymic (nude) mice.* Journal of Investigative Dermatology, 1975. **64**: p. 307-312.
 116. Fraki, J., R. Briggaman, and G. Lazarus, *Uninvolved skin from psoriatic patients develops signs of involved psoriatic skin after being grafted onto nude mice.* Science, 1982. **215**(4533): p. 685-7.
 117. Villadsen, L., et al., *Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model.* J. Clin. Invest., 2003. **112**(10): p. 1571.

118. Wrone-Smith, T. and B. Nickoloff, *Dermal injection of immunocytes induces psoriasis*. J Clin Invest, 1996. **98**(8): p. 1878–1887.
119. Takizawa, Y., et al., *Engraftment of precursor lesions of human cutaneous neoplasms onto C.B-17 SCID mice: A useful in vivo experimental model of carcinogenesis in human skin*. Archives of Dermatological Research, 1995. **287**(3-4): p. 237-241.
120. van Rijn, R., E. Simonetti, and A. Hagenbeek, *A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2-/ γ c-/-double-mutant mice*. Blood, 2003.
121. Sandhu, J., et al., *A Human Model of Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease in Scid Mice Engrafted With Human Peripheral Blood Lymphocytes*. Transplantation, 1995. **60**(2): p. 179-84.
122. Koppi, T., et al., *CMRF-44 antibody-mediated depletion of activated human dendritic cells: a potential means for improving allograft survival*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1723-30.
123. Wilson, J., et al., *Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(2): p. 387.
124. Wang, X., et al., *Skin explant model of human graft-versus-host disease: prediction of clinical outcome and correlation with biological risk factors*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(2): p. 152-9.
125. Takakura, I., et al., *An in vivo model of human skin acute graft-versus-host disease: transplantation of cultured human epidermal cells and dermal fibroblasts with human lymphocytes into SCID mice*. Experimental hematology, 1999. **27**(12): p. 1815-1821
126. Matsumoto, M., Y. Katoh, and Y. Nakamura, *Injection of CD4+ and CD8+ cells with donor or host accessory cells induces acute graft-vs-host disease in human skin in immunodeficient mice*. Experimental hematology, 2001. **29**(6): p. 720-727
127. Hessel, H., J. Mittermöller, and H. Zitzelsberger, *Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation* Histochemistry and cell Biology, 1996. **106**(5): p. 481-485.
128. Meyer, R., et al., *Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation*. Blood, 2007. **109**(1): p. 374-82.
129. Haniffa, M., et al., *Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(2): p. 371-385.
130. Shultz, L. and F. Ishikawa, *Humanized mice in translational biomedical research*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 118-130
131. Kaufmann, R., V. Mielke, and J. Reimann, *Cellular and molecular composition of human skin in long-term xenografts on SCID mice*. Experimental dermatology, 1993. **2**(5): p. 209–216.
132. Racki, W., et al., *NOD-scid IL2Rnull Mouse Model of Human Skin Transplantation and Allograft Rejection*. Transplantation, 2010. **89**(5): p. 527-536.
133. Gourlay, W., et al., *Importance of Natural Killer Cells in the Rejection of Hamster Skin Xenografts*. Transplantation, 1998. **65**(5): p. 727-34.

134. Santini, S., P. Rizza, and M. Logozzi, *The Scid Mouse Reaction To Human Peripheral Blood Mononuclear Leukocyte Engraftment: Neutrophil Recruitment Induced Expression of A Wide Spectrum of Murine Cytokines and Mouse Leukopoiesis, Including Thymic Differentiation*. Transplantation, 1995. **60**(11): p. 1331-1602.
135. Eckert, R. and J. Crish, *The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation*. Physiological reviews, 1997. **77**(2): p. 397-424.
136. Becker-Pauly, C., et al., *The alpha and beta Subunits of the Metalloprotease Mepripin Are Expressed in Separate Layers of Human Epidermis, Revealing Different Functions in Keratinocyte Proliferation and Differentiation*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**: p. 1115–1125.
137. Mommaas, A., et al., *Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ*. European Journal of Immunology, 1995. **25**(2): p. 520-5.
138. Kolb, H., et al., *Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2462-5.
139. del Hoyo, G., et al., *Characterization of a common precursor population for dendritic cells*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1043-7.
140. Czernielewski, J. and M. Demarchez, *Human Langerhans cells in epidermal cell culture, in vitro skin explants and skin grafts onto "nude" mice* Archives of Dermatological Research, 1984. **276**(5): p. 288-292.
141. Cardone, M., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-1321
142. Villablanca, E., *A two step model for Langerhans cell migration to skin draining LN*. European Journal of Immunology, 2008. **38**(11): p. 2975–2980.
143. Ouwehand, K. and S. Santegoets, *CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis*. European journal of Immunology, 2008. **38**(11): p. 3050–3059.
144. Griffiths, C., R. Dearman, and M. Cumberbatch, *Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man*. Cytokine, 2005. **32**(2): p. 67-70.
145. Kobayashi, Y. and M. Staquet, *Development of motility of Langerhans cell through extracellular matrix by in vitro hapten contact*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(9): p. 2254–2257.
146. Krueger, G., R. Daynes, and M. Emam, *Biology of Langerhans cells: Selective migration of Langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts on nude mice*. PNAS, 1983. **80**(6): p. 1650–1654.
147. Aberer, W., et al., *Effects of physicochemical agents on murine epidermal Langerhans cells and Thy-1-positive dendritic epidermal cells*. Journal of Immunology, 1986. **136**(4): p. 1210-6.
148. Volc-Platzer, B., et al., *Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient*. New England journal of medicine, 1984. **310**: p. 1123-1124.
149. Geissmann, F., et al., *Transforming Growth Factor β 1, in the Presence of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin 4, Induces Differentiation of Human Peripheral Blood Monocytes into Dendritic Langerhans Cells* Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**(6): p. 961.
150. Larregina, A., et al., *Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells*. Nature Immunology, 2001. **2**(12): p. 1151-8.

151. Wegner-Kops, J., *Untersuchung der dendritischen Zellen nach Xenotransplantation humaner Haut auf immundefiziente Mäuse*. 2010: Mainz.
152. Gilliam, A., I. Kremer, and Y. Yoshida, *The Human Hair Follicle: A Reservoir of CD40+ B7-Deficient Langerhans Cells that Repopulate Epidermis After UVB Exposure*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998. **110**: p. 422–427.
153. Thomas, J., M. Biggerstaff, and J. Sloane, *Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin*. *The Histochemical Journal*, 1984. **16**(5): p. 507-519.
154. Hemmerling, J., et al., *Human epidermal Langerhans cells replenish skin xenografts and are depleted by allo-reactive T cells in vivo*. *Journal of Immunology*, 2011. **in review**.
155. Chorro, L., et al., *Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network*. *The Journal of experimental medicine*, 2009. **206**(13): p. 3089
156. Obata M, T.H., *Alteration in murine epidermal Langerhans cell population by various UV irradiations: quantitative and morphologic studies on the effects of various wavelengths of monochromatic radiation on Ia-bearing cells*. *Journal of investigative Dermatology*, 1985. **84**(2): p. 139-45.
157. Baadsgaard, O., et al., *Dose response and time course for induction of T6-DR+ human epidermal antigen-presenting cells by in vivo ultraviolet A, B, and C irradiation*. *J Am Acad Dermatol.*, 1987. **17**(5 Pt 1): p. 792-800.
158. Kölgen, W., H. Both, and H. van Weelden, *Epidermal Langerhans Cell Depletion After Artificial Ultraviolet B Irradiation of Human Skin In Vivo: Apoptosis Versus Migration*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002. **118**: p. 812–817.
159. Krueger, G., *Biology of Langerhans cells: analysis by experiments to deplete Langerhans cells from human skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1984. **82**: p. 613–617.
160. Beilhack, A., et al., *Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2919-2928.
161. Ishikawa, F., et al., *Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor gamma-chain(null) mice*. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1565-73.

7. ANHANG

7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
200x	zweihundertfach
400x	vierhundertfach
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDC	Konventionelle myeloide DC (<i>conventional myeloid dendritic cell</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	Colony Stimulating Factor
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
DDC	Dermale dendritische Zellen
dest	destilliert
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfonamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBSS	Earls balanced salt solution
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISpot	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Technique</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GF	Gesichtsfeld
GM	Granulocyte macrophage
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt
Gy	Gray
HE	Hämalaun-Eosin
HIER	Hitzebehandlung (<i>heat induced epitope retrieval</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>Human leucocyte antigen</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation (<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>)
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin

Kat	Katalog
KE	Kultureinheit
LC	Langerhanszelle
LPS	Lipopolysaccharide
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin Methode
MACS	Magnetically Activated Cell Sorting
mg	Miligramm
MHC	Major hisocompatibility Complex
ml	Milliliter
MLDC	Mixed lymphocyte dendritic cell culture
MLR	Mixed lymphocyte reaktion
mm	Milimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NOD	Non-obese diabetic
NSG	NOD/SCID gamma chain
PBS	Phosphat-buffered-saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin
pH	pondus Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PP	Polypropylen
RIC	Reduced irradiation conditioning
RPMI	nach: Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
TBI	Total body irradiation
TBS	Tris-buffered-saline
TE	Testeinheit
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozytenkultur
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit
µl	Mikroliter