

## **Universitäts- und Landesbibliothek Tirol**

### **Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo**

**Ortner, Ulrike**

**1994**

***Modulation und Migration  
der Langerhans Zellen  
in vitro und in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der gesamten Heilkunde“  
an der medizinischen Fakultät der  
Leopold-Franzens-Universität  
Innsbruck

eingereicht von Ulrike Ortner  
Juni 1994

erarbeitet am  
Immunologischen Labor der Hautklinik  
Anichstraße 35  
A-6020 Innsbruck



Vorstand: Prof. Dr. Peter Fritsch  
Betreuer: Prof. Dr. Gerold Schuler

(Dg 25675)



1995:00407

19.11.1995  
Dg 25675

*Die Sonne am Horizont  
steht nie am Abgrund,  
am Abgrund stehen wir,  
wenn unser Horizont  
nicht bis zur Sonne reicht*

(Willi Gritsch)



## Vorwort

In diesem Jahr, in dem ich im immunologischen Labor an der Hautklinik Innsbruck gearbeitet habe, konnte ich viele Erfahrungen machen und die Grundzüge und Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens erlernen. Abgesehen von den praktischen Erfahrungen lernte ich auch, die Wissenschaft besser einschätzen zu können. Dies verdanke ich in erster Linie Herrn Prof. Dr. P. Fritsch, der mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Er verwies mich an Prof. Dr. Gerold Schuler, welcher an der Hautklinik Innsbruck das wissenschaftliche Labor leitet und somit meine Betreuung übernahm. Bei ihm möchte ich mich besonders bedanken, daß er neben seinem dreifachen Engagement in Klinik, Forschung und Lehre immer noch Zeit für Diskussionen und Ratschläge gefunden hat.

Vor allem haben Doz. Dr. Nikolaus Romani und Dr. Franz Koch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, indem sie mir beim Erlernen des wissenschaftlichen Arbeitens in Theorie und Praxis zur Seite standen und sich für meine Fragen Zeit immer genommen haben. Für ihre Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken und auch dafür, daß Doz. Dr. Romani trotz vielseitigem Engagement sich noch die Zeit nahm, mein Manuskript durchzusehen.

Ach den übrigen Mitarbeitern, vor allem aber Frau Bettina Trockenbacher, welche mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und auch Frau Daniela Brang möchte ich nochmals für ihre Unterstützung danken.

Auch meinen Freunden und besonders meiner Lern- und Studienkollegin Agnes möchte ich hiermit für ihre treue Freundschaft, in der sie mir in allen Höhen und Tiefen beistand, herzlichst danken, sowie meinem Freund Reinhold, der in all den Jahren viel Geduld und Verständnis aufbrachte und mich immer unterstützte. Ein weiterer wichtiger Begleitaspekt dieser Dissertation war die Tatsache, daß ich mich mit dem Computerwesen auseinandersetzen mußte. Für die Hilfe bei meinen ersten Gehversuchen in der Computerei möchte ich Manfred für seine Zeit und Geduld danken.

In allererster Linie möchte ich mich aber bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglichten und mir in all den Jahren das Gefühl vermittelten, daß sie voll hinter mir stehen. Aus Dankbarkeit widme ich vor allem ihnen diese Arbeit.



## Inhaltsverzeichnis

<b><u>I. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.) <u>Das System der dendritischen Zellen</u>	1
a) Entdeckung und Charakterisierung	1
b) Vorkommen	2
c) Geschichte der Langerhans Zellen: Von der Nervenzelle zur immunkompetenten Zelle	3
2.) <u>Funktion der Langerhans Zelle während der Immunantwort</u>	7
1) Funktionelle Aspekte während der Induktionsphase	7
a) LZ als periphere Wachposten des Immunsystems Prozessierung und Präsentation des Antigens	7
b) Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von antigenspezifischen T-Zellen	9
c) LZ stimulieren ruhende T-Zellen	11
2) Funktionelle Aspekte während der Elizitationsphase	13
3.) <u>Fragestellung</u>	14
<b><u>II. Material und Methoden</u></b>	<b>15</b>
1.) <u>Versuchstiere</u>	15
2.) <u>Kulturmedium</u>	15
3.) <u>Die Organkultur</u>	16
a) Versuchsanordnung	16
b) Praktische Durchführung	17
c) Ernten der ausgewanderten Zellpopulation	17
4.) <u>Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten und ihre Färbung</u>	18
5.) <u>Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“ und ihre Färbung</u>	21
6.) <u>Mikroskopische Auswertmethoden</u>	24
7.) <u>Methoden zur Bestimmung der funktionellen Kapazität</u>	25
a) Messung der Fähigkeit zur Stimulation ruhender T-Lymphozyten Prinzip und Methodik der Oxidativen Mitogenese	25
b) Messung der Fähigkeit zum Prozessieren von Proteinen Prinzip und Methodik von antigenspezifischen Proliferationsassays	27

<b><u>III. Das Organkultursystem</u></b>	<b>29</b>
1.) <u>Einleitung</u>	29
2.) <u>Fragestellung</u>	31
3.) <u>Versuche/Ergebnisse</u>	32
3.1 In vitro-Kultur von Tag 1 - Tag 3	32
Morphologische Veränderungen der epidermalen LZ in situ	
3.2 Akkumulation der DZ in der Dermis	33
3.3 Ins Kulturmedium ausgewanderte Zellen	35
3.4 Morphologische und phänotypische Charakteristika	37
3.5 Funktionelle Eigenschaften der DZ	37
3.6 Modifikation des Organkultursystems	37
a) Das modifizierte System	37
b) Verhalten der Migration im verlängerten Zeitraum	42
c) Entwicklung und Reifung während der Organkultur	44
4.) <u>Diskussion</u>	48
<b><u>IV. Mechanismen der Migration</u></b>	<b>61</b>
1.) <u>Einleitung</u>	61
2.) <u>Fragestellung</u>	64
3.) <u>Versuche/Ergebnisse</u>	65
3.1 Unterschiedliche Versuchsansätze mit Zugabe von Zytokinen	65
a) Das „klassische“ Organkultursystem	65
b) Das „modifizierte“ Organkultursystem	67
c) Das „getriggerte“ System	73
3.2 Verschiedene Versuchsansätze mit Antizytokinen	75
a) Zugabe von Anti-TNF- $\alpha$	75
b) Zugabe von Anti-IL-1 $\beta$	83
3.3 Ein <i>in vivo-in vitro</i> Kombinationssystem	84
a) Spezielle Methodik	84
b) Versuche/Ergebnisse	85
4.) <u>Diskussion</u>	91

<b><u>V. TNF-alpha Zytotoxizitätsassay</u></b>	<b>96</b>
1.) <u>Einleitung</u>	96
2.) <u>Material und Methoden</u>	97
3.) <u>Fragestellung</u>	100
4.) <u>Versuche/Ergebnisse</u>	101
4.1 TNF- $\alpha$ Nachweis in Organkulturüberständen	101
4.2 Wie lange ist zugefügter TNF- $\alpha$ in der Organkultur nachweisbar ?	101
4.3 Austestung von Anti-TNF- $\alpha$ im Zytotoxizitätsassay	101
5.) <u>Diskussion</u>	103
<b><u>VI. Sekretoneurin</u></b>	<b>104</b>
1.) <u>Einleitung: Sekretoneurin, ein neues Neuropeptid</u>	104
2.) <u>Fragestellung</u>	105
3.) <u>Versuche/Ergebnisse</u>	106
3.1 Ist Sekretoneurin in der Epidermis oder Dermis vorhanden?	106
3.2 Einfluß von Sekretoneurin auf das Organkultursystem	106
a) Das „klassische“ System	107
b) Das „modifizierte“ System	107
c) Das „getriggerte“ System	109
d) Das „geblockte“ System	111
3.3 Wirkung auf Reifung und Antigenpräsentation der DZ	112
4.) <u>Diskussion</u>	116
<b><u>VIII. Zusammenfassung / Summary</u></b>	<b>118</b>
<b><u>IX. Literatur</u></b>	<b>120</b>

## Abkürzungen

Ak	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
DZ	Dendritische Zellen
dx	day x
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluoreszein - isothiacyanat
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MLR	Mixed Leukocyte Reaction
R 10	Routinemäßig verwendetes Kulturmedium
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
OXMI	Oxidative Mitogenese
PBS/BSA	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 1% bovinem Serumalbumin
SN	Sekretoneurin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
mTNF- $\alpha$	muriner TNF-alpha
rhTNF- $\alpha$	rekombinanter humaner TNF-alpha
U	Unit
UV-B	Ultraviolett-B-Licht

# I. Einleitung

## 1.) Das System der dendritischen Zellen

### a) Entdeckung und Charakterisierung

Die dendritischen Zellen (DZ) sind ein, aus dem Knochenmark stammender Zelltyp, welcher zu den Antigenpräsentierenden - Zellen gehört (APZ) [1]. Erstmals wurden sie von Steinman und Cohn 1973 aus Mäusemilzen isoliert [2]. Ihren Namen verdanken sie ihrer äußerst charakteristischen Morphologie. Dieses verzweigte, dendritische Erscheinungsbild ist besonders deutlich bei den dendritischen Zellen der Epidermis, den Langerhanszellen [3] ausgeprägt. Nicht verwechselt werden dürfen sie mit den ebenfalls dendritisch aussehenden Melanozyten, welche sich in der Basalschicht der Epidermis befinden und neuroektodermalen Ursprungs sind, sowie den Merkel-Zellen, welche sich ebenfalls in der Basalschicht der Epidermis und auch in den epithelialen Haarwurzelscheiden befinden. In Abhängigkeit vom Mausstamm gibt es in der Epidermis noch Thy-1 positive DZ, bei denen es sich um T-Zellen handelt, die einen gamma/delta T-Zell-Rezeptor besitzen. Im Humansystem konnten nur sehr vereinzelt gamma/delta-positive Zellen dargestellt werden.

Die Identifikation der DZ erfolgt durch eine Kombination von morphologischen [12, 13], phänotypischen [5] und funktionellen [1,6,7] Merkmalen.

Während gewebeständige DZ Fortsätze mit rundem Querschnitt zeigen, welche Zellorganellen beinhalten, ist ihre Morphologie und ihr Verhalten in der Zellkultur einzigartig. Ihre dünnen, segelartigen Zytoplasmaausstülpungen (die sogenannten "veils") enthalten keine Organellen. Sie werden ständig ausgestülpt und wieder retrahiert. Weiters exprimieren die DZ typischerweise eine große Anzahl von MHC Klasse II-Molekülen sowie auch MHC Klasse I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie z.B. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD54) und LFA-3 (Leukocyte function associated antigen-3, CD58) sowie Moleküle mit kostimulatorischer Funktion bei der T-Zellaktivierung, wie z.B. B7/BB1 (CD80) werden exprimiert, während die typischen Makrophagenmarker (unspezifische Esterase, Oberflächen-ATPase, CD14, CD68, F4/80 Makrophagenmarker) nicht oder nur in sehr schwachem Maße vorkommen. Dieses Markerprofil weist auf die immunologische Aufgabe der DZ hin und es differenziert sie weitgehend vom

Monozyten/Makrophagen-System. Die DZ dienen als antigenpräsentierende Zellen für CD4<sup>+</sup>-Helfer T-Zellen und sind daher entscheidend wichtig zur Auslösung aller T-Zell-abhängigen Immunantworten, wie z.B. der (allergischen) Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV), der Abstoßung von Organtransplantaten und der Bildung von T-Zell-abhängigen Antikörpern. Weiters sind sie, nach dem bisherigen Wissensstand, die einzigen Zellen, die die Fähigkeit haben, naive, bisher nicht mit Antigen in Kontakt gelangte T-Zellen (ruhende T-Zellen) zu aktivieren, d.h. also eine primäre Immunantwort auszulösen. Vor allem dadurch unterscheiden sie sich markant von den als Prototyp der antigenpräsentierenden Zellen geltenden Makrophagen, aber auch von den B-Lymphozyten und den humanen venulären Endothelzellen, die in bestimmten Situationen ebenfalls als APZ dienen können. Diese Zellen können aber lediglich bereits sensibilisierte T-Zellen aktivieren, und spielen somit nur bei sekundären Immunantworten wichtige Rollen.

## **b) Vorkommen**

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung wurden die DZ in verschiedenen lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben sowie im Blutkreislauf gefunden. Ihre Population macht in den meisten Fällen weniger als 1% der vorhandenen Zellen aus, was ihre Gewinnung und Charakterisierung aufwendig und schwierig macht.

### **\*DZ in lymphatischen Organen:**

Im Lymphknoten befinden sich die DZ in den parakortikal gelegenen T-Zellarealen und werden dort als interdigitierende Retikulumzellen bezeichnet. In der Milz besiedeln sie die periarteriolären T-Zellareale [8, 9]. Auch im Thymus und den humanen Tonsillen konnten DZ definiert werden [9, 10].

### **\*DZ im Blutkreislauf:**

Obwohl die Isolierung und Anreicherung (ursprünglich <0,1%) schwierig ist, stellt das Blut im Humansystem die Hauptquelle für die Gewinnung DZ dar. Sowohl im Blut [11, 12] als auch in der afferenten Lymphe [15, 16] kommen die DZ in Form von "veiled cells" vor, während die efferente Lymphe keine "veiled cells" enthält [1, 17].

### **\*DZ in nicht-lymphatischen Organen:**

DZ, welche eine hohe Anzahl von MHC II-Molekülen exprimieren, wurden schon in vielen Organen gefunden, so z.B. in den Epithelien der Luftwege [18, 19], wobei sich die Zellen hier

phänotypisch und morphologisch von den Makrophagen unterscheiden und eine starke Aktivität zur T-Zell-Stimulation besitzen. Zellen gleichen Charakters wurden weiters im Interstitium des Herzens, des Darms, der Niere und der Leber [1] gefunden. Die in den Pankreasinseln vorzufindenden DZ sind für die Abstoßungsreaktion eines Pankreastransplantates verantwortlich. Dies wurde in einer experimentellen Transplantation von allogenen Inseln gezeigt [20]. Letztlich wurden DZ auch in der Haut, sowohl in der Epidermis [3, 5] als auch in der Dermis [3, 21, 22] charakterisiert. Der in der Epidermis gefundene DZ-Typ wird als Langerhans Zelle definiert und stellt die am besten charakterisierte, nichtlymphatische DZ dar.

### **c) Geschichte der Langerhans Zellen: Von der Nervenzelle zur immunkompetenten Zelle**

Der Medizinstudent Paul Langerhans entdeckte 1868 in Berlin eine neue Population von intraepidermalen Zellen mit dendritischer Gestalt. Da sich in seinen mit Goldchlorid gefärbten Hautpräparaten die "Nervenfaser" (Dendriten) bis in die Dermis fortsetzten, schloß er daraus, daß es sich um Nervenzellen handeln müsse [11]. Viele Jahre lang wurden sie dann kaum beachtet, bis sie Anfang der 50er Jahre als Nervenzelle im Rahmen des neurohormonalen Systems von Wiedmann wieder auftauchten [23]. Später wurden die LZ als "verbrauchte" Melanozyten betrachtet.

Erst die Elektronenmikroskopie ermöglichte die Entdeckung einer spezifischen Zytoplasmaorganelle, des Birbeck-Granulums, wodurch die LZ endgültig als eigener Zelltyp definiert werden konnte. [24]. Das Auffinden dieser Birbeck-Granula in Histozyten im Rahmen der Histozytosis X bewies ihre mesenchymale Natur. Nach Auffindung von Oberflächenmolekülen, wie MHC II Molekül, Fc-Rezeptor und Komplementrezeptor, war ihre Natur als immunkompetente Zelle festgelegt. Knochenmarksstudien [25, 26] bestätigten die Herkunft der LZ aus dem Knochenmark und erlaubten somit die Klassifikation der LZ als Leukozyten. Die Bestimmung des Phänotyps gelang erst nach Etablierung der Methoden zur Produktion von monoklonalen Antikörpern [27].

K. Wolff stellte als erster epidermale Häutchenpräparate ("sheets") her, wodurch endlich eine quantitative Einschätzung der LZ-Verteilung möglich war. Somit entdeckte er, daß die Anzahl der LZ von Körperregion, Alter, Geschlecht und Haplotyp der Maus abhängig war und starken Schwankungen unterworfen war [21, 28].

Die ersten funktionellen Studien an LZ wurden von G. Stingl, S.I. Katz & Kollegen durchgeführt, wobei sie die LZ als Stimulator von proliferativen und zytotoxischen T-

Zellantworten erkannten [6, 29]. Die klassische Arbeit von Silberberg läßt vermuten, daß den LZ bei der Kontaktsensibilisierung eine wesentliche Bedeutung zukommt [30].

Aufgrund der Immunkompetenz und der Expression typischer Makrophagenmarker wie ATP-ase, unspezifische Esterase, Fc- und Komplementrezeptoren wurden die LZ primär dem Makrophagen/Monozyten-System zugerechnet [31]. Das Oberflächenantigen NLDC-145 oder auch das S100-Protein sowie die relativ schwache Phagozytosefähigkeit [11, 32] machten auf Dauer diese Hypothese unhaltbar. Die Experimente von Schuler & Steinman, die die LZ für kurze Zeit kultivierten, brachten die Erklärung, daß es sich bei LZ um unreife dendritische Zellen handeln müsse [7,33], denn in der Kultur (3 Tage) erfahren die LZ tiefgreifende morphologische, phänotypische und funktionelle Veränderungen, die sie zu typischen DZ heranreifen lassen. Während der 3-Tagekultur und in Anwesenheit von Keratinozyten oder von GM-CSF entwickeln die LZ die typischen, von den Milz-DZ her bekannten, beweglichen Zytoplasmaaustülpungen ("veils"). Außerdem verlieren sie (Maus) bzw. vermindern sie massiv (Mensch) die Birbeck- bzw LZ-Granula. Zusätzlich umfaßt die phänotypische Veränderung eine starke Zunahme der MHC-Moleküle [33, 34] auf der Zelloberfläche sowie einen Verlust bzw. starke Reduktion der Makrophagenmarker (Fc-Rezeptoren, F4/80 Makrophagen-spezifisches Antigen [35, 36], ATP-ase, unspezifische Esterase). Weiters vermehren sie an ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle für die Kontaktaufnahme mit T-Zellen (ICAM-1 (CD54) [35-37], LFA-3 (CD58) [36], B7/BB1 (CD80) [38, 39, 40]) sowie auch MHC Klasse 1 Moleküle. Somit präsentieren kultivierte, epidermale LZ denselben Phänotyp wie DZ aus der Milz oder dem Blut [5, 7]. Diese Beobachtung gilt sowohl für das murine wie auch für das humane System.

Auch funktionelle Veränderungen finden während der Kultur von LZ statt. Während frisch isolierte LZ, die ein in vitro-Äquivalent der residenten LZ darstellen, schwache Stimulatoren für ruhende T-Zellen sind, können sie ihre stimulatorische Kapazität nach Kurzzeitkultivierung in Gegenwart von GM-CSF auf das 30- bis 100-fache steigern. Dieses Phänomen kann man in der MLR (mixed leukocyte reaction) aber auch in der polyklonalen T-Zell-Proliferation, die im Innsbrucker Labor in Form der Oxidativen Mitogenese (OXMI) getestet wird, beobachten. Nach Kurzzeitkultivierung sind die LZ also funktionell den aus der Milz gewonnen DZ gleichwertig [3, 34] und außerdem sind sie, im Gegensatz zu unreifen DZ, in der Lage, T-Zellen antigenunspezifisch zu binden ("clustering") [41, 42]. Während man früher dachte, daß die Stimulationszunahme von T-Zellen mit der Zunahme vom MHC-II Molekülen parallel lief, haben genauere Experimente gezeigt, daß die Zunahme von MHC-II Molekülen wesentlich früher einsetzt als die T-Zell-Stimulation [41]. Der Höhepunkt der T-

Zell-Stimulation ist am Tag 3 zu finden. Das Zytokin GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor) scheint in diesem Reifungsprozeß die Hauptrolle zu spielen [43, 44].

Mit Hilfe von peptidspezifischen T-Zellhybridomen konnte gezeigt werden, daß frische LZ Proteinantigene sehr gut in immunogene Peptide proteolysieren („antigen processing“) und diese dann in ihren MHC-II-Molekülen binden können. Die sauren Zellorganellen, die in frisch isolierten LZ in großer Zahl vorhanden sind [45], sind wahrscheinlich für die Peptidverarbeitung verantwortlich. Da in dieser Phase ebenfalls die Biosynthese von MHC II-Molekülen stark läuft[46-48], scheinen gerade frisch isolierte LZ besonders gut für die Verarbeitung von Antigenen spezialisiert zu sein. Im Verlauf der Kultur verlieren sie die sauren Organellen [45], die MHC-Biosynthese [46] vermindert sich und sie verlieren die Fähigkeit Prozessieren von Proteinen. Peptide jedoch, die nicht prozessiert werden müssen, können auch noch von kultivierten LZ präsentiert werden [49].

Diese Studien haben also ergeben, daß kultivierte LZ praktisch identisch sind mit lymphoiden DZ, und daß die beiden essentiellen Eigenschaften zur Aktivierung von ruhenden T-Zellen, nämlich

- 1) die Bildung eines Liganden (d.h. des MHC/Antigen-Komplexes) für den antigen-spezifischen T-Zellrezeptor, und
- 2) die Sensibilisierung der T-Zellen (d.h. das antigenunspecifische Binden der T-Zellen sowie die Bildung der notwendigen kostimulatorischen Signale) auf unterschiedlichen Stufen der Zelldifferenzierung vorkommen.

Frisch isolierte LZ sind also gute „Prozessierer“ und „Präsentierer“ von Antigenen aber schlechte Stimulatoren von ruhenden T-Zellen; kultivierte LZ zeigen ein umgekehrtes Verhalten. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen in vitro Reifungsprozeß gibt der Lebenszyklus: Eine noch unbekannte Vorläuferzelle aus dem Knochenmark wandert in die peripheren Gewebe aus (z.B. Epidermis) und verweilt dort in einem unreifen Stadium als residente LZ. Sie stellen also nun ein Reservoir von unreifen DZ dar, welche nach Antigenkontakt zur Migration stimuliert werden, entlang der afferenten Lymphbahnen wandern und in den lymphatischen Organen als reife DZ ankommen. Nachdem bisher noch keine DZ in den efferenten Lymphbahnen gefunden werden konnten, glaubt man nicht, daß die DZ zirkulieren, sondern daß die lymphatischen Organe die Endstation darstellen. Somit könnte also ein durch die Haut eingedrungenes Antigen von den unreifen LZ entgegengenommen und prozessiert werden und nach ihrer Reifung während der Wanderung eine spezifische T-Zellantwort in den lymphatischen Organen ausgelöst werden [1, 7, 50, 51,

52]. Dieser Prozeß ist deshalb sinnvoll, weil in den Geweben wie Epidermis, Dermis, Darmwand, Lungenepithel etc. die Anzahl der T-Lymphozyten relativ gering ist und somit nur ein geringe Chance bestünde, daß die antigenbeladene LZ den passenden antigenspezifischen T-Zellrezeptor findet.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß in den nichtlymphatischen Organen, im Blut, in der afferenten Lymphe und in den lymphatischen Geweben DZ vorkommen, die alle ähnliche Eigenschaften besitzen und im Verlauf ihres Lebens einen ähnlichen Reifungsprozeß durchlaufen. Dies führte also dazu, die DZ als eine eigene Zellreihe zu klassifizieren [1, 53]. Nachdem es in jüngster Zeit gelungen ist, proliferierende DZ aus dem Blut [54, 55] und dem Knochenmark [56] zu züchten, ist es zunehmend wahrscheinlicher geworden, daß eine gemeinsame Vorläuferzelle von Monozyten und DZ existiert.

## **2.) Die Funktion der Langerhans Zelle während einer Immunantwort**

### **1) Funktionelle Aspekte während der Induktionsphase**

DZ sind hochspezialisiert auf eine primäre Immunantwort. Nach Steinman [1] werde ich die Mechanismen, die zu einer spezifischen Immunantwort führen, in drei Funktionen aufteilen:

- a) DZ als periphere Wachposten des Immunsystems;  
     Prozessierung und Präsentation des Antigens („Wächterfunktion“, „sentinel function“)
- b) Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von antigenspezifischen T-Zellen („Migrationsfunktion“)
- c) LZ stimulieren ruhende T-Zellen („Adjuvansfunktion“)

### **ad a) LZ als periphere Wachposten des Immunsystems;**

#### **Prozessierung und Präsentation des Antigens:**

Wie gezeigt wurde, können frisch isolierte LZ, also unreife DZ, lösliche Antigene sehr gut prozessieren. Die Bedeutung dieser Funktion kann gut am Modell der Kontaktallergie demonstriert werden. Durch die Applikation eines niedermolekularen Kontaktallergens (zB. DNCB, Oxazolon, Picrylsäure) in vivo, werden intraepidermale Proteine modifiziert und stellen somit ein Antigen dar [57]. Dieses nun "fremde" Protein wird von den LZ zu kurzen immunogenen Peptiden proteolysiert, welche dann in unbekannter Weise in die neu synthetisierten MHC-II-Moleküle eingepaßt und im weiteren auf der Zelloberfläche der LZ exprimiert werden [57, 58]. Es konnte gezeigt werden, daß LZ, die aus Hapten-behandelter Epidermis isoliert wurden, dieses Antigen in immunogener Form an der Oberfläche tragen: Sie können damit antigenspezifische T-Zellen stimulieren [59]

Auch nach Aerosolbehandlung mit Proteinen wurde das Protein als präsentiertes Antigen in der Lunge gefunden. Weiters erschien das Antigen auf DZ in den afferenten Lymphbahnen nach Injektion eines Proteins in die Dermis, und auch im Thymus konnten entsprechende peptidbeladene DZ nach i.v. Injektion von Protein gefunden werden [1]. DZ sind in Bezug auf diese Fähigkeit zur Aquisition und Verarbeitung von Antigen in vivo eindeutig besser als andere Zelltypen, wie Makrophagen oder B-Lymphozyten [60].

Wir wollen die Vorgänge an der Haut näher betrachten:

Es wurde beobachtet, daß nach epikutaner Applikation von Kontaktallergen haptensbeladene DZ in den regionalen Lymphknoten erschienen [61]. Hauser & Co. [62, 63] demonstrierten in vitro, daß LZ haptensisierte Antigene aufnehmen können, um sie dann ruhenden T-Zellen in hochimmunisierender Form zu präsentieren. Wenn man nun diese, durch LZ stimulierten T-Zellen, in normale Mäuse transferiert, können sie dort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren [62]. Trägt man aber ein Hapten auf Haut auf, deren LZ - Anzahl durch UV-Bestrahlung massiv vermindert wurde, so kann keine Kontaktsensibilisierung mehr erfolgen, sondern es kommt zur Toleranzentwicklung [64]. Somit scheint die Wachpostenfunktion der epidermalen LZ, zumindest was die Kontaktsensibilisierung betrifft, wahrscheinlich. Dermale DZ haben dabei eine unterstützende Funktion [65, 66].

Für den speziellen Fall der Nickelallergie konnte die Gruppe von Sinigaglia [67] zeigen, daß das Nickel-Ion an das Histidin prozessierter, dh. MHC-gebundener Peptide bindet. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß der therapeutische Effekt von Gold bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus funktioniert, indem sich das Gold an den MHC/Peptid-Komplex anlagert und dadurch die Präsentation des Selbstantigens an die spezifischen T-Zellen stört. Durch diesen, derartig veränderten, MHC/Peptid-Komplex kann aber die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen generiert werden, was die Ursache der gefürchteten Komplikation, einer Typ IV-Reaktion gegen Gold, sein könnte.

Es besteht noch kein Konsens darüber, ob eine Prozessierung eines kleinmolekularen Haptens zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort notwendig ist. Während die Arbeit von Romagnoli/Sinigaglia gegen die Notwendigkeit des Prozessierens spricht [67], weist der Bericht von Kolde eher schon darauf hin, da es nach seinen Untersuchungen nach Kontaktallergen-Applikation zu einer vermehrten endozytotischen Aktivität sowie zu einer vermehrten Ausbildung von LZ-Granula kommt [68].

Viel weniger weiß man über die Möglichkeit der Präsentation von Tumor- oder viralen Antigenen im MHC I-Molekül. Es wurde zwar die Fähigkeit von epidermalen LZ beschrieben, daß sie Allo-Antigene präsentieren könnten und somit eine allo-spezifische zytotoxische T-Zellantwort auslösen könnten [47], aber es gibt keine detaillierten Studien, welche die Antigenpräsentation im MHC I-Molekül von unreifen und reifen LZ vergleicht. Man fand lediglich, daß DZ aus lymphatischen Organen virale Antigene gut präsentieren und so die virus-spezifischen zytotoxischen Lymphozyten aktivieren können. Dieser Mechanismus wurde bei Herpes simplex, Influenza, Moloneyleukämie und Sendai gezeigt [1]. Ebenso gibt

es Hinweise darauf, daß LZ Tumorgewebe in immunogener Weise prozessieren können [69, 70]. Auch weiß man wenig über den Einfluß von Zytokinen auf die LZ-Funktionen dieser Entwicklungsstufe. Es wäre jedoch ein Einfluß der Zytokine TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor-alpha), Interferon-gamma und Interleukin 4 zu erwarten, da sie einen Einfluß auf die Biosynthese der MHC Moleküle haben [71-74].

Einige Experimente weisen aber eher auf eine hemmende Rolle des TNF- $\alpha$  bei der Antigenpräsentation hin. Wie schon erwähnt, prozessieren frisch isolierte, hoch angereicherte LZ lösliches Proteinantigen und präsentieren es als immunogenen Peptid/MHC-Komplex auf ihrer Oberfläche. Wenn während der 3d dauernden Kultur die Gegenwart von keratinozytenkonditionierten Medium oder von GM-CSF gewährleistet ist, dann können die LZ am d3 ein spezifisches T-Zell-Hybridom stimulieren, und zwar mit den Peptid/MHC Komplexen, die sie 3d zuvor generiert haben. Werden frische LZ dagegen mit TNF- $\alpha$  kultiviert, so prozessieren sie natives Protein mit unverminderter Effizienz, aber es kommt am d3 zu keiner Stimulation des Hybridoms. Exogen zugeführtes Peptid wird ausgezeichnet präsentiert. Es scheint also, als ob TNF- $\alpha$  zu einem Verlust von immunogenen Peptiden führte [75].

#### **ad b) Die Migration aus der Peripherie ins lymphatische Gewebe sichert das Auffinden von antigenspezifischen T-Zellen.**

Üblicherweise treffen Antigene primär auf Oberflächenepithelien. Somit liegen also die unreifen DZ in der Epidermis strategisch günstig, um Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, wie oben beschrieben wurde. Nachdem sich in der Haut relativ wenig T-Lymphozyten befinden, erscheint es sinnvoll, daß antigenbeladene LZ die Epidermis verlassen und über die afferenten Lymphgefäße in die parakortikalen T-Zellareale der Lymphknoten auswandern. Diese Erkenntnis stammt aus relativ frühen Hauttransplantationsstudien [77] und Kontaktsensibilisierungsstudien [78], die gezeigt haben, daß die afferenten Lymphgefäße intakt sein müssen, um eine immunologische Reaktion zu erhalten. Am Anschaulichsten wurde diese Migrationsfähigkeit von peripheren Organen zu Lymphorganen durch die Transplantation von Herzen gezeigt, wobei DZ des Transplantates in die Milz wanderten und dort auch nachgewiesen werden konnten [79].

Nach bisherigem Verständnis wird also auch nach Applikation eines Antigens auf die Haut, dieses Antigen prozessiert und über die abfließenden Lymphwege als immunologisch wirksamer MHC/Peptid- oder MHC/Peptid/Hapten-Komplex abtransportiert. Es gibt einige Studien, die diesen Effekt (meist indirekt) zeigen:

1. Nach Applikation von Kontaktallergenen kommt es in der Epidermis zur Abnahme der LZ-Zahl um ungefähr ein Drittel [2, 80, 81].
2. Larsen & Co. [82] studierten die Wanderungsfähigkeit direkt. Sie konnten in einem Organkulturmodell zeigen, daß die Anzahl der LZ in der Epidermis sich vermindert, während die MHC-Klasse II- positiven Zellen in der darunterliegenden Dermis sich vermehren. Viele dieser stark MHC-Klasse II-positiven dermalen Zellen scheinen sich in Gefäßen (eventuell Lymphgefäße) zu sammeln (cords). Nach drei Tagen konnte er typisch aussehende DZ finden, die aus dem Organ in das Medium gewandert waren. Die Beobachtungen im Humansystem waren ähnlich [22].  
Aufgrund dieser Ergebnisse übernahm ich dieses Organkultursystem für meine weiteren Studien (siehe später).
3. Untersucht man die abfließenden Lymphgefäße und die regionären Lymphknoten nach epikutaner Kontaktsensibilisierung, so erkennt man eine Zunahme von DZ, die teilweise auch die für die LZ typischen Birbeckgranula enthalten [30, 61, 83].
4. Nachdem Kimber & Co. das Kontakallergen Fluorescein-Isothiocyant auf die Flanken von Mäusen applizierte, konnten sie eine massive Zunahme von DZ, die zum Teil Birbeckgranula enthielten, in den Lymphknoten finden, die fähig waren, FITC-spezifische T-Zellen zu stimulieren [84]. Dieselben Ergebnisse konnten nach Applikation von Dinitrochlorobenzol gefunden werden [21].
5. Kripke & Co. [85] transplantierten allogene Haut. Sie applizierten Kontaktallergen auf das Transplantat und sahen, daß es möglich war, mit DZ aus den Lymphknoten von Transplantationsmäusen, gesunde Mäuse zu sensibilisieren.
6. Die Mechanismen, welche zu dieser Migration führen, sind bis heute unbekannt. Verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/CD 54, LFA-3/CD 58), die auf den heranreifenden LZ vermehrt ausgebildet werden, dürften dabei eine Rolle spielen [86-89]. Umgekehrt könnte auch das E-Cadherin-Molekül eine wichtige Rolle spielen. Es wird auf heranreifenden LZ herabreguliert [90]. Wieweit Zytokine dafür verantwortlich gemacht werden können, ist noch weitgehend unklar. Es gibt jedoch einige Hinweise, daß TNF- $\alpha$  diesbezüglich eine wichtige Rolle spielen könnte.
  - a) Vermeer & Streilein [91] fanden nach intradermaler Injektion von TNF- $\alpha$  eine Abnahme

der LZ in den anschließend angefertigten Epidermal“sheets“.

b) Cumberbatch & Kimber injizierten Mäusen TNF- $\alpha$  intradermal und konnten anschließend eine Akkumulation von DZ in den Lymphknoten [92] feststellen und eine Abnahme von LZ in der Epidermis [93]. Nur muriner rekombinanter TNF- $\alpha$  war imstande eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der DZ-Anzahl in den regionären Lymphknoten zu verursachen, während muriner rekombinanter GM-CSF und auch hitzeinaktivierter muriner TNF- $\alpha$  unter denselben Bedingungen ohne Wirkung blieben. Auch der ebenso verwendete humane TNF- $\alpha$  konnte keine ähnlichen Ergebnisse liefern. Zusätzliche Hinweise ergab die PCR-Analyse der epidermalen Zytokinproduktion unter verschiedenen Bedingungen: Es kam zu einem Anstieg der Zytokine TNF- $\alpha$  und GM-CSF in der Epidermis nach Applikation von Irritantien und sensibilisierenden Substanzen. Die sensibilisierenden Substanzen führten, genauer gesagt, zu einer Erhöhung der m-RNA für Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interferon-induziertes Protein 10 (IP-10) und Makrophagen-inflammatorisches Protein 2 (MIP-2) [94, 95].

### **ad c) LZ binden ruhende T-Zellen und aktivieren deren Proliferation**

Die antigenbeladenen DZ müssen in die regionären Lymphorgane wandern, damit sie überhaupt die Gelegenheit haben, für ihre MHC/Peptide bzw. MHC/Peptid/Hapten-Komplexe, spezifische T-Zellklone zu finden. Sind die T-Zellen stimuliert, proliferieren sie und produzieren Zytokine. Die Aktivierung der passenden T-Zellen erfolgt in drei Schritten [52]:

- 1) Reife DZ, wie wir sie nach der Migration in die Lymphknoten vorfinden, sind fähig, ruhende T-Zellen in einer antigenunabhängigen Weise in relativ stabilen aber reversiblen Aggregaten zu binden [41, 42, 96]. Wahrscheinlich kann auf diese Weise aus einem großen Angebot von T-Zellen die passende T-Zelle herausgefunden werden. Das Phänomen der Bildung von großen Zellaggregaten ("cluster"-Bildung) kann im Phasenkontrastmikroskop gut beobachtet werden. Bis dato sind die molekularbiologischen Mechanismen für dieses Phänomen nicht bekannt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die im Zuge des Reifungsprozesses der LZ an deren Oberfläche zur Expression kommenden Adhäsionsmoleküle dafür mitverantwortlich sind. Das antigenunspezifische "clustering"

kann nur bei reifen DZ, wie z.B. bei kultivierten LZ [13, 35, 36, 40], und nicht bei anderen APZ beobachtet werden.

- 2) Als nächster Schritt erfolgt die antigenspezifische Bindung zwischen DZ und T-Zelle, also die Bindung des MHC-Antigenkomplexes an den passenden T-Zell-Rezeptor.

Biochemische und molekularbiologische Studien zeigen, daß APZ nur eine geringe Anzahl von streng definierten immunologisch wirksamen Peptiden präsentieren und zusätzlich eine große Zahl Peptide von größerer Variationsbreite [12, 97]. Eine APZ, insbesondere eine DZ kann also eine sehr große Zahl von verschiedenen Peptiden präsentieren.

Wahrscheinlich werden sehr wenige identische MHC-Peptidkomplexe benötigt (wenige 100), um ruhende T-Zellen zu stimulieren. Das anti-CD3-Mitogenese-Modellsystem [98] und andere Studien [99] weisen auf die Notwendigkeit einer geringen Anzahl hin [68].

- 3) Für die T-Zell-Proliferation sind weiterhin noch kostimulatorische Signale nötig, welche von DZ gebildet werden [100]. Diese Signale sind aber biochemisch noch nicht vollständig identifiziert [101], lediglich für das B7/BB1 (CD80)-Molekül, welches auf reifen DZ exprimiert wird [38, 39, 40], wurde eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen [102-104].

Für diesen, oben beschriebenen, Reifungsprozeß, wird vor allem das Zytokin GM-CSF verantwortlich gemacht [105, 106]. Auch das Zytokin IL-1 $\alpha$  zeigte einen positiven Effekt nach Zugabe zu, in GM-CSF kultivierten, LZ, indem die stimulatorische Kapazität nochmals um das Zweifache anstieg [44]. Im Gegensatz dazu kann TNF- $\alpha$  die LZ in Kultur zwar durchaus viabel erhalten, induziert aber nur eine unvollkommene Reifung, sodaß, mit TNF- $\alpha$  kultivierte, LZ schwache Stimulatoren von ruhenden T-Zellen bleiben [76]. Koch & Kämpgen konnten zeigen, daß bereits prozessiertes Antigen unter dem Einfluß von TNF- $\alpha$  seine immunogene Form in der MHC-Peptidbindungsgrube verliert, und somit TNF- $\alpha$ , in gewisser Weise, eine immunsuppressive Wirkung hat [75].

## 2.) Funktionelle Aspekte während der Elizitationsphase

### (Die kutane Immunantwort bei nochmaligen Antigenkontakt)

In der Induktionsphase erfolgte eine Aktivierung des Immunsystems:

- 1) Nach Aktivierung der T-Zellen im Lymphknoten kommt es zu einer massiven Proliferation von T-Blasten, die dann in großer Anzahl über die efferente Lymphe und den Ductus thoracicus ins Blut gelangen.
- 2) Die T-Blasten exprimieren jetzt weniger "Homingreceptoren" für HEV (high endothelial venules), sodaß sie nicht mehr ständig durch den Lymphknoten zirkulieren bzw. dort zurückgehalten werden. Es wird vermehrt CLA-Antigen, welches vom monoklonalen Antikörper HECA-452 erkannt wird [107], exprimiert, welches sich als passender Ligand an das ELAM-1-Molekül bindet, das vor allem in Hautgefäßen zu finden ist [88, 108, 109]. Somit können aktivierte T-Zellen selektiv in der Haut akkumulieren. In anderen Geweben wirken andere gewebs-/organspezifische Adhäsionsmoleküle.

Bei wiederholtem Allergenkontakt kommt es in der Haut zu einer lokalen Extravasation und Akkumulation von Entzündungszellen. Neben einer erhöhten Zytokinproduktion durch die Keratinozyten, die unter anderem eine chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Entzündungszellen hat, kommt es auch zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten, welche zu einer intraepidermalen Akkumulation von LFA-positiven Leukozyten führt [110]. Andererseits wird durch das Allergen vermehrt ELAM-1 an den Hautgefäßen exprimiert, wodurch es zu einer verstärkten Ansammlung von T-Blasten im Entzündungsareal kommt. Die schon in großer Zahl vorhandenen, also präformierten, T-Blasten werden erneut zur Proliferation stimuliert, wobei diese Proliferation nicht nur von antigenpräsentierenden DZ aktiviert werden kann, sondern von sämtlichen anderen MHC-II-positiven APZ, wie z.B. Makrophagen oder unreifen LZ [111]. Dadurch kommt es zu einer wesentlich massiveren T-Blasten-Proliferation als bei der Primärantwort, bei der ja nur die ruhenden T-Zellen durch die antigenpräsentierenden, reifen DZ aktiviert werden. Stimulierte T-Blasten produzieren wiederum chemotaktisch wirksame Zytokine (Interferon gamma, TNF- $\beta$ , Interleukin 2), die weitere Entzündungszellen aktivieren. Durch diese überschießende Reaktion kommt es z.B. zum klinischen Bild einer Kontaktdermatitis.

### **3. Fragestellung**

Das System der DZ, ihre Reifung, und ihre Funktion innerhalb des Immunsystems wurde, wie oben beschrieben, schon von vielen Seiten untersucht und dokumentiert. Trotzdem gibt es noch zahlreiche Lücken und offene Fragen, sodaß die DZ wohl noch lange Zeit ein zentraler Punkt im wissenschaftlichen Interesse bleiben wird. Ich konzentrierte mich in meinen Studien weitgehend auf das Phänomen der Migration und deren mögliche Auslöser:

- 1) Primär erfolgte die Auslotung eines Organkultursystems, das teilweise von Larsen [82] übernommen wurde, und dessen Modifikation bzw. Verfeinerung von mir vorgenommen wurde. Weiters folgten Versuche zur Darstellung der Migration der LZ in den Lymphgefäßen in Form von Färbeexperimenten und zur Kinetik der DZ-Reifung in der Kultur.
- 2) Welche Zytokine und andere Faktoren könnten für die Migration der LZ aus der Epidermis bzw. Dermis in das Medium verantwortlich sein? Hier versuchte ich einerseits durch Zugabe verschiedener Zytokine die Migration zu verstärken, andererseits, mit Hilfe von Antizytokinen, eine Hemmung der Migration zu erreichen. Durch Veränderung verschiedener Faktoren (Ablagezeit, serumfreies Medium, unterschiedliche Mausstämme, wie vor allem LPS-resistente C3H-Mäuse) sollten zur Aufklärung der Migrationsfaktoren führen.
- 3) Einige Untersuchungen wiesen darauf hin, daß TNF- $\alpha$  ein möglicher Faktor für die Migration wäre. Mit Hilfe eines Bioassays versuchte ich, TNF- $\alpha$  in den Kulturen zu messen.
- 4) Sekretoneurin, ein neues Neuropeptid [100], wurde als Migrationsstimulator für Monozyten aus dem Blut in die Peripherie entdeckt und postuliert [101]. Somit könnte es auch eine Wirkung auf die LZ-Migration haben und wurde somit im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie ausgetestet.

## II. Material und Methoden

### 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in erster Linie Inzuchtmäuse vom Stamm Balb/c verwendet. Im immunologischen Labor der Hautklinik Innsbruck werden die meisten Experimente mit diesem Stamm durchgeführt, sodaß ein reiches Repertoire an Erfahrungen, Daten und geeigneten Reagenzien vorhanden ist. Hier in diesen Experimenten wurden sehr oft weibliche, 2-6 Monate alte Balb/c Mäuse verwendet. Diese haben den Vorteil einer großen Anzahl und gleichmäßigen Verteilung von LZ, sowie eines sehr geringen Anteils an dendritischen epidermalen T-Zellen unter den Epidermalzellen, und somit sind sie für Studien an den Langerhanszellen besonders gut geeignet. Die Tiere entstammen der hauseigenen Inzucht, die unter Aufsicht von Dr. Franz Koch nach Bewilligung angelegt wurde. Weiters wurden noch zusätzlich C3H-Mäuse sowie C3H/HEJ/Cr-IBR (LPS-resistente Mäuse) verwendet, welche von Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland zugekauft wurden.

### 2. Kulturmedium

In den meisten Versuchen wurde als Kulturmedium „R10“ verwendet, d.h. RPMI 1640 (Seromed Biochrom, Berlin)

- +10% fötales Kälberserum (FCS, Gibco Laboratories, Paisley, GB), hitzeinaktiviert (56°C/30min)
- +5µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO)
- +20µg Gentamycin (JRH, Bioscience)
- +200 mM L-Glutamin (Sebac, Stuben, A)

Weiters wurde ein serumfreies Medium, „Aim V“ (Gibco/ BRL, Gaithersburg, MD), verwendet. Dieses wurde lediglich versehen mit

- +200mM L-Glutamin
- +5µM 2-Mercaptoethanol
- +20µg Gentamycin

### **3. Die Organkultur**

#### **a) Versuchsanordnung**

Die Kultivierung der dorsalen Ohrhälften wurde ausschließlich in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen („well“) (Costar Nr.3524, Cambridge, MA) vorgenommen. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß in diesen Platten das Verhältnis Volumen des Mediums/Oberfläche am Günstigsten ist (Zitat aus Dissertation M. Heine). Pro „well“ habe ich 1,5ml Kulturmedium verwendet. Diese Menge entstand als Kompromiß aus einerseits möglichst viel Medium aufgrund des Verbrauchs durch das Organ und andererseits möglichst wenig Medium, um die Menge der zugefügten Zytokine relativ gering zu halten.

Üblicherweise wurden die Ohrhälften dann auf das Medium aufgelegt, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, und nach 1-3 Tagen zu „sheets“ (siehe unten) weiterverarbeitet. Das inzwischen stark verfärbte Medium wurde abgesammelt, gepoolt, zentrifugiert und die ins Medium ausgewanderten Zellen nach Zugabe von Trypanblau (Seromed Biochrom KG, Berlin), welches eine Unterscheidung zwischen toten und viablen Zellen ermöglicht, im Hämozytometer gezählt. Zur weiteren Beurteilung wurden die Zellen großteils noch zu Zytopräparaten weiterverarbeitet und später gefärbt.

Durch eine Modifikation des Systems meinerseits kamen noch ein paar interessante Aspekte hinzu. In dem eben beschriebenen „klassischen System“ ist es nicht möglich, die täglich ausgewanderten Zellen genauer zu beurteilen. Außerdem war mir aufgefallen, daß das Medium innerhalb weniger Stunden schon seine Farbe stark veränderte, also verbraucht zu werden schien. Deshalb begann ich, die gleichen Ohrhälften jeden Tag auf neues Medium zu transferieren. So hatte ich nun die Möglichkeit, die Anzahl der täglich ausgewanderten Zellen über einen längeren Zeitraum zu erheben und deren Funktionszustand und Reifungszustand zu untersuchen. Ergebnisse siehe später!

## **b) Praktische Durchführung**

1. Zuerst werden die Mäuse mit Hilfe von CO<sub>2</sub> getötet und die Ohren dann mit einer gebogenen Schere an der Basis abgeschnitten.
2. Zwei Petrischalen werden mit 70%igem Alkohol gefüllt, in eine dritte Petrischale wird ein steriler Tupfer gelegt. Die Ohren werden durch die beiden Petrischalen mit Alkohol gezogen, um sie zu desinfizieren und anschließend auf dem sterilen Tupfer zum Trocknen aufgelegt.
3. Nach ca 15 min Trockenzeit können nun die beiden Ohrhälften auseinandergezogen werden (Diese Trockenzeit wurde stark variiert; siehe später). Das Ohr wird mit der Knorpelseite (der ventralen Seite) nach unten auf steriler Unterlage aufgelegt. Nun setzt man am Besten mit einer geraden sterilen Pinzette am Schnitttrand an und zieht mit einer gebogenen Pinzette die dorsale Ohrhälfte in einem Stück ab.
4. Mit der dermalen Seite nach unten werden die dorsalen Ohrhälften jetzt auf die schon vorbereiteten 1,5ml Medium in der 24-well Gewebekulturplatte aufgelegt, möglichst ohne daß die epidermale Seite naß wird. Prinzipiell können auch die ventralen, also Knorpelseiten aufgelegt werden, jedoch ist die Anzahl der ausgewanderten dendritischen Zellen deutlich niedriger und die weitere Präparation aufwendiger. Aus diesem Grund wurde auf die ventralen Knorpelseiten verzichtet.  
Diese Schritte werden in der Sterilbank durchgeführt.
5. Nun kann die Kultur in den Brutschrank gestellt werden und je nach Bedarf 1-3d bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert werden.

## **c) Ernten der ausgewanderten Zellpopulation**

Die auf dem Medium aufschwimmenden Ohrhälften werden mit einer Pinzette vorsichtig abgehoben und zur Herstellung von „sheets“ auf Amoniumthiocyanatlösung aufgelegt (siehe Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“). Das Medium wird aufpipettiert und der Inhalt von je 6 wells in einem Polypropylenröhrchen gesammelt. Jedes well wird mit etwas R10 nachgespült, um möglichst alle Zellen zu erwischen. Die Suspension wird nun mit 1500 Upm (263g) bei 4°C für 8 min zentrifugiert, der Überstand bis auf das “pellet” abgesaugt und in 300µl R10 resuspendiert. Im Hämocytometer kann nun die Zählung der ausgewanderten

Zellen erfolgen, wobei es hier, bei diesen niederen Zellzahlen, notwendig ist, alle 9 Felder im Hämozytometer auszuzählen, um eine bessere Genauigkeit zu erreichen.

#### **4. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten und ihre Färbung**

Die Zellsuspension wurde soweit in R 10 verdünnt, daß 200µl ungefähr 30.000-40.000 Zellen enthalten ( $1,5-2,0 \times 10^5$  Zellen/ml). Je 200µl werden in einem kleinen Trichter in der Zytozentrifuge (Cytospin 2, Shandon) für 6 min bei 4500U<sub>rpm</sub> auf einen Objektträger zentrifugiert.

Die Präparate müssen ca. 30 min lufttrocknen und können dann bei -20°C eingefroren werden oder zur weiteren Verarbeitung 5 min mit Azeton fixiert werden.

Im Folgenden können die Präparate mit Immunfluoreszenz- oder Peroxidasetechnik gefärbt werden.

##### **Färbeprotokoll:**

1. Um das Abfließen der Antikörper und Waschlösungen weitgehend zu verhindern, müssen die Zellen mit einem speziellen Fettstift (PAP-Pen, Daigo Sangyo Co., Japan) umrandet werden.
2. Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe Tab.II.1):  
50µl Antikörperlösung werden auf den Objektträger aufpipettiert, und alle Präparate in der feuchten Kammer bei 37°C 30 min lang inkubiert.
3. Waschen mit PBS/BSA (phosphate buffered saline/bovine serum albumin 1%). Dazu wird der Puffer von der eine Seite mit einer Pasteurpipette langsam aufgeträufelt und anschließend von der anderen Seite wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wird 6-10-mal wiederholt.
4. Inkubation mit dem zweiten Antikörper (siehe Tab.II.2):  
Es wurden weitgehend biotinylierte Ak verwendet, welche zu 50µl auf den Objektträger aufgetragen werden, und diese anschließend wieder 30 min bei 37°C inkubiert werden.

##### **Peroxidase:**

In diesem Schritt kann gleichzeitig die endogene Peroxidase geblockt werden. Zu 800µl PBS/BSA gibt man 100µl 2-molare βD-Glucoselösung und 100µl Glucose-Oxidase mit einer Konzentration von 15 U/ml.

Mit dieser Pufferlösung wird der Sekundäntikörper 1:200 verdünnt. Sollte das Abblocken der endogenen Peroxidase nicht erwünscht oder notwendig sein, verdünnt man den

Sekundärantikörper einfach mit PBS/BSA im Verhältnis 1:200.

Immunfluoreszenz:

Sekundärantikörper 1:200 verdünnt mit PBS/BSA.

5. Waschen mit PBS/BSA.

6. Inkubation mit dem dritten Antikörper/Immunreagenz:

Wiederum 30min bei 37°C inkubieren:.

Peroxidase:

Peroxidasekonjugat (Streptavidin horseadish peroxidase complex von Amersham Int. plc, Amersham, UK) 1:100 mit PBS/BSA verdünnt.

Immunfluoreszenz:

Fluoreszenzkonjugat (Streptavidin-Fluorescein von Amersham Int. plc, Amersham, UK) 1:300 mit PBS/BSA verdünnt.

7. Waschen mit PBS/BSA

8. Immunfluoreszenz:

Hiermit ist die Färbung beendet und die Objektträger werden nur noch mit Einbettmedium (mounting medium for fluorescence, Vectashield, Vector, Burlingame, CA; vertrieben von Scandic, Wien) eingedeckt.

Peroxidase:

Hier muß das Peroxidasekonjugat erst durch die Diaminobenzidin-Reaktion visualisiert werden:

9. Hierfür werden 10 mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Polysciences, Inc, Warrington, PA) in 20 ml Tris-HCL-Puffer mit pH 7,6 aufgelöst und filtriert.

10. Unmittelbar vor der Inkubation werden 5µl 30%-iges Perhydrol (Merck, Darmstadt) dazugegeben.

11. Inkubation der Präparate für 10 min mit 50µl Diaminobenzidinlösung.

12. Waschen mit Tris-HCL-Puffer, pH 7,6

13. Gegenfärben der Kerne mit Hämatoxylinlösung (nach Böhmer, Gatt, Ibk):

Übergießen der, in eine Küvette gestellten, Objektträger mit Hämatoxylin. Nach 15-20 sec beenden der Reaktion durch Waschen mit lauwarmen, fließendem Wasser.

14. Eindecken der Präparate mit PBS/Glycerin 1:9 gemischt.

Tab.II.1

<i>Name</i>	<b>ATCC</b>	<b>Ig-Klasse</b>	<b>CD</b>	<b>Antigen-Spezifität</b>	<b>Ref.</b>
<i>B21/2</i>	TIB 229	Ratte G2b		I-A <sup>b,d</sup>	[10, 71]
<i>NLDC-145</i>		Ratte G2a		DC	
<i>2A1</i>		Ratte G2a		Intrazelluläre Organellen in reifen DZ u. B-Zellen	[54, 56]
<i>10.216</i>	TIB 93	Maus G2b		I-A <sup>kr,f,g</sup>	[112]
<i>MK-D6</i>	HB 3	Maus G2a		I-A <sup>d</sup>	
<i>14-4-4S</i>	HB 32	Maus G2a		I-E <sup>d,k</sup>	[113]
<i>M342</i>		Hamster-Ig		Intrazelluläre Organellen in reifen DZ u. B-Zellen	[9]
<i>F4/80</i>	HB 198	Ratte G2b		Makrophagen	[114, 115]
<i>RB6-8C5</i>		Ratte G2b		Granulozyten	
<i>HO-13.4</i>	TIB 99	Maus M	CDw90	Thy-1.2	
<i>B5/5</i>		Ratte G2b	CDw90	Thy-1.2	[116]
<i>GK 1.5</i>	TIB 207	Ratte G2b	CD 4	Helfer T-Zellen	
<i>KJ16</i>		Ratte G2a		TCR $\alpha,\beta$	[112]
<i>BE29G1</i>		Ratte G2b	CD54	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül- 1/ICAM-1	[117]
<i>Anti-SN</i>		Kaninchen-Ig		Sekretoneurin	
<i>Serum 101</i>		Kaninchen-Ig	CD1a	anti-murine-CD1a	

Legende: ATCC: American Typ Culture Collection, Rockville, MD

CD: cluster of differentiation

Ref.: Referenzen

TCR: T Zell Rezeptor

Tab.II.2

Je nach verwendeten Primärantikörper kamen folgende Sekundärantikörper zur Anwendung:

1. Schaf-anti-Maus IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, ganzer Antikörper
2. Schaf-anti-Ratte IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, ganzer Ak.
3. Esel-anti-Kaninchen IgG, biotinyliert, spezies-spezifisch, ganzer Ak,(alle von Amersham int., plc, Amersham UK)

## **5. Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“ und ihre Färbung**

Aus verschiedensten Gründen wird die Ohrhaut für die Präparation von murinen Langerhanszellen bevorzugt:

- Die Ohrhaut ist nur sehr spärlich behaart, was für die spätere Betrachtung im Mikroskop von großem Vorteil ist.
- Die Herstellung der Häutchenpräparaten („sheets“) ist relativ einfach, da sich nach richtiger Vorbereitung die Epidermis von der Dermis gut abziehen läßt.
- Die Anzahl der LZ ist hier besonders hoch und sehr gleichmäßig, sodaß eine Veränderung in der Zelldichte recht leicht gesehen und numerisch ausgewertet werden kann.

### **Herstellung der „sheets“:**

- Die dorsalen Ohrhälften werden aus der Kultur entnommen oder frisch getrennt, wie oben beschrieben, und auf einer 0,5 molaren Amoniumthiocyanat in Phosphatpuffer mit der dermalen Seite nach unten aufgelegt.

Rezept:  $0,1\text{M Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 8,9\text{g}/500\text{ml Aqua dest.}$

$0,1\text{M KH}_2\text{PO}_4 = 6,8\text{g}/500\text{ml Aqua dest.}$

(beides von Merck, Darmstadt, Deutschland)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wird in 500ml Aqua dest. gelöst und davon der pH-Wert gemessen. Dann wird so lange  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , welches auch in 500ml Aqua dest. gelöst wurde, dazugegeben, bis der

pH-Wert der Gesamtlösung 6,8 ergibt. Dies ergibt dann einen 0,1 molaren Na-K-Phosphatpuffer mit pH-wert von 6,8. In diesen Puffer wird Ammoniumthiocyanat (Merck, Darmstadt, Deutschland) 0,5 molar Lösung gelöst (=3,8g Ammoniumthiocyanat auf 100ml Phosphatpuffer).

So werden die Ohrhälften 20min bei 37°C inkubiert. Diese Zeit muß bei der Herstellung von "sheets", die aus Ohrhäften von im serumfreien AIM V-Medium inkubierten Kulturen stammen, auf 5-10 min gesenkt werden, sonst ist keine erfolgreiche Trennung von Epidermis und Dermis mehr möglich. Durch die Serumfreiheit kann die Ammoniumthiocyanatlösung ihre Wirksamkeit stärker entfalten (mögliche Abpufferung durch die Proteine).

- Nun werden die Ohrhälften herausgehoben, auf einem Tropfen PBS ausgebreitet und mit 2 feinen Pinzetten die Epidermis von der Dermis getrennt. Das große Epidermisstück wird in kleine (ungefähr 3x3 mm) „sheets“ geschnitten. Die dermalen Ohrhälften belasse ich zur besseren Unterscheidbarkeit ganz. Erst unmittelbar vor dem Färbevorgang werden auch die dermalen Ohrhälften zu 3x3mm großen „sheets“ zugeschnitten.

Zur Fixation werden die „sheets“ für 20min bei Raumtemperatur in Azeton gegeben.

- Waschvorgang: 1x in reinem PBS, 2x in PBS/BSA  
Jetzt können die „sheets“ in Alufolie verpackt und bei -20°C eingefroren oder gleich weiter gefärbt werden.

### **Färbeprotokoll:**

1. Am schnellsten erfolgt die Färbung mit dem sogenannten „sheet-shifter“ (der von dem ehemaligen Kollegen Dr. Peter Stöger erfunden wurde), welcher es ermöglicht, die kleinen „sheets“ recht schnell und vor allem ohne Beschädigung von einem well der 96-well-Platte in das Nächste zu transferieren.
2. Inkubation mit dem 1. Antikörper (siehe Tab.II.1):  
50µl von einem supernatant (unverdünnter Kulturüberstand von antikörperproduzierenden Hybridomen) oder einem gereinigten Antikörper in entsprechender Verdünnung. Die Inkubation erfolgt ca. 16 Stunden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C oder 90 min bei 37°C.
3. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.

4. Inkubation mit dem 2. Antikörper (siehe Tab.II.2)  
90 min mit biotinyliertem Ak 1:200 verdünnt bei 37°C inkubieren.
5. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.
6. Inkubation mit dem 3. Antikörper/Immunreagenz:  
Fluoreszenz:  
90 min Inkubation mit Streptavidin-FITC 1:300 verdünnt mit PBS/BSA bei 37°C inkubieren bzw mit Streptavidin Texas Red (beide von Amersham Int.,plc Amersham, UK) 1:50 verdünnt.  
Peroxidase:  
90 min Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1:100 verdünnt mit PBS/BSA bei 37°C.
7. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.
8. Die Fluoreszenzfärbung ist hiermit abgeschlossen. Die „sheets“ werden nun mit der dermalen Seite nach oben (Kontrolle unter dem Stereomikroskop (Reichert, Austria) in „mounting medium for fluorescence“ (Vectashield) auf dem Objektträger eingebettet.
9. Bei der Peroxidasefärbung muß der Peroxidasekonjugat erst visualisiert werden:  
Dazu werden 10mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in 20ml Tris-HCL-Puffer (pH 7,6) aufgelöst; erst unmittelbar vor der Inkubation müssen 5µl 30%-iges Perhydrol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dazugegeben werden. Mit dieser Lösung werden die „sheets“ noch ca 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend
- 10.3 x 20 min mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, gewaschen.
- 11.Jetzt können auch diese „sheets“ mit der dermalen Seite nach oben (Stereomikroskopkontrolle) in PBS-Glycerin, 1:9 gemischt, auf einem Objektträger eingebettet werden.

## **6. Mikroskopische Auswertmethoden:**

- **Phasenkontrastmikroskopie:**

Der Verlauf der Organkultur wurde mit einem Nikon Invert- Mikroskop Diaphot-TMD beobachtet.

- **Fluoreszenzmikroskopie:**

Fast alle Beobachtungen wurden an einem kombinierten Fluoreszenzmikroskop mit Aufsichtfluoreszenz (Orthoplan II, Leitz, Wetzlar, Deutschland) gemacht. Die Ermittlung der LZ-Anzahl/mm<sup>2</sup> erfolgte durch das randomisierte Auszählen von mindestens 9 Gesichtsfeldern je sheet mittels eines im Okular integrierten Zählfeldes. Dieses Zählfeld wurde mit einem Objektmikrometer kalibriert.

Die Auszählung der epidermalen „sheets“ gestaltete sich einfach, da die Verteilung der DC in Balb/c-Mäusen relativ regelmäßig ist, und somit auch eine Abnahme der Zellzahl unschwer zu erkennen ist und sich leicht exemplarisch und fotografisch (siehe Abbildung 1 a-d) dokumentieren läßt. Die Auswertung der dermalen „sheets“ ist wesentlich diffiziler,

1. wegen der größeren Dicke der Dermis, welche aber sehr ungleichmäßig ist, und
2. wegen der ungleichmäßigen Verteilung der DC in derselbigen. Nur durch starkes Fokussieren gelangen ein Großteil der DC zur Ansicht. Dadurch konnten sie aber nicht ausgezählt werden und wurden daher nur deskriptiv ausgewertet.

Die Fluoreszenzpräparate eines Versuchsansatzes wurden alle mit der gleichen Belichtungszeit (2 min), teilweise aber mit verschiedenen Vergrößerungen fotografiert. Durch gleiche Vergrößerungen und gleiche Belichtungszeiten ist eine objektive Vergleichsmöglichkeit der Färbintensität möglich.

- **Durchlichtmikroskopie:**

Die meisten Zytozentrifugenpräparate wurden mit der Immunperoxidase Technik gefärbt und mit Durchlichtmikroskopie (Leitz-Orthoplan II, Leitz, Wetzlar, Germany) begutachtet. Sie gaben vor allem Auskunft über den prozentuellen Anteil der positiv gefärbten DC und boten somit eine Kontrollmöglichkeit der im Hämocytometer ausgezählten Daten.

## **7. Methoden zur Bestimmung der funktionellen Kapazität**

### **a) Messung der Fähigkeit zur Stimulation ruhender T-Lymphozyten:**

#### **Prinzip und Methodik der Oxidativen Mitogenese (OXMI)**

##### **Prinzip:**

Als Standardsystem zur Bestimmung der funktionellen Kapazität wird in der Regel die MLR (mixed leukocyte reaktion) verwendet. Dabei handelt es sich jedoch um ein allogenes System, welches einige Tage beansprucht und dann eine oligoklonale Proliferation induziert.

Eine alternative Methode stellt die OXMI dar [34]. Hierbei werden syngene T-Zellen durch die Anwesenheit von Antigenpräsentierenden Zellen zur polyklonalen Proliferation stimuliert. Diese Proliferation ist direkt abhängig von der Funktionstüchtigkeit und der Anzahl der APZ, wodurch die OXMI als Standarduntersuchung zur Bestimmung der immunstimulatorischen Kapazität der APZ verwendet werden kann. Die T-Zellen sind vom selben Mausstamm wie die APZ. Durch Veränderung ihrer Oberfläche mittels Perjodierung werden die T-Zellen aber empfänglich für Stimuli von syngen APZ. Der Vorteil dieser Methode liegt in der polyklonalen Proliferation einerseits und in der wesentlich kürzeren Dauer des Assays andererseits, wobei auch weniger APZ pro Ansatz gebraucht werden.

##### **Methodik:**

Die für die OXMI benötigten T-Zellen stammen aus den Milzen und mesenterialen Lymphknoten von Mäusen desselben Haplotyps wie die APZ. Aus den Milzen und Lymphknoten wird durch Zerteilen der Organe eine Zellsuspension hergestellt, durch hypotone Lyse von Erythrozyten befreit und vorsichtig auf eine mit Nylonwolle gestopfte Säule pipettiert. Durch die unterschiedliche Größe der Zellen wandern sie in unterschiedlichem Tempo durch das enge Maschenwerk. Die T-Zellen werden dabei von adhärennten Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen weitgehend befreit, und sind aufgrund ihrer Kleinheit die ersten Zellen, die am unteren Ende dieser Nylonwollsäule wieder herauskommen.

Entscheidend ist am Ende die Perjodierung der T-Zellen, welche zu einer Veränderung der

Oberflächenstruktur und damit zu einer "Entfremdung" der APZ führte. Damit wird eine Stimulation zur T-Zellproliferation in Anwesenheit experimentell zugeführter syngener APZ erst ermöglicht. Nach mehreren Waschungen werden die T-Zellen mit 0,5 % NaIO<sub>4</sub> Lösung in PBS 15 min bei 37°C inkubiert. Über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (45%-54%-63%) werden die Zellen noch in "gute" und "schlechtere" T-Zellen aufgetrennt [98]. Dabei sammeln sich tote Zellen in der Schicht zwischen Kulturmedium und 45% Percoll; restliche APZ und Lymphoblasten akkumulieren in der 45%-54% Zwischenschicht. Die weitgehend APZ-freien, kleinen runden, ruhenden T-Zellen finden sich in der 54%-63%-Interphase. Diese T-Zell-Population wurde für die Experimente hergenommen, denn die Reinheit der T-Zellen bestimmt die von experimentell zugeführten APZ-unabhängige Eigenproliferation, welche möglichst gering sein sollte und als Kontrolle mitbegutachtet werden muß.

### **Durchführung:**

Die OXMI wird in einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte (Falcon, Nr. 3072) durchgeführt. Die APZ werden in einer Verdünnungsreihe von 3000, 1000, 300 und 100 Zellen/100µl/well in Triplikaten ausplattiert. Wegen der hohen immunstimulatorischen Aktivität, welche ein typisches Merkmal der kultivierten LZ und DZ ist, kann die Verdünnungsreihe eventuell noch weiter auf 30 und 10 Zellen/100µl/well fortgesetzt werden. In einem weiteren Schritt werden 300.000 perjodierte T-Zellen in 100µl/well dazugegeben. In einem Endvolumen von 200µl/well wird der Ansatz nun genau 24 h bei 37°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum werden pro well 50µl [<sup>3</sup>H] Thymidin (Endkonzentration 148 kBq= 4µCi/ml; 247,9 GBq= 6,7 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) dazugegeben, welches in die proliferierenden T-Zellen eingebaut wird und so eine Messung der Proliferation ermöglicht.

Nach weiteren 16 Stunden bei 37°C wird der Prozeß gestoppt indem man die Platte bis zur späteren Weiterverarbeitung in den Kühlschrank stellt. In einem Zell-Erntegerät (PHD-Cell-Harvester, Cambridge Technology, Inc., MA) werden die Zellen geerntet und mit einem Filterpapier aufgefangen. Diese Filterpapierchen werden in Szintillationsflüssigkeit (Optiszint-High-Safe, Pharmacia) aufgelöst und somit kann die in die Zellen eingebaute Radioaktivität als proportionale Fluoreszenz in einem Flüssigszintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia, Wien) gemessen werden. Die angegebenen Werte stellen einen Mittelwert aus den Triplikaten dar (SD < 10 %), sie werden als „counts per minute“ (cpm) angegeben.

## **b) Messung der Fähigkeit zum Prozessieren von Proteinen:**

### **Prinzip und Methodik von antigen-spezifischen Proliferations-Assays**

#### **Prinzip:**

Eine besondere Eigenschaft von frischen LC stellt die Fähigkeit zum Prozessieren von Antigenproteinen dar. Das Prozessieren des Antigens ist ein intrazellulärer Prozeß, bei dem das Antigen von den DC aufgenommen wird, durch intrazelluläre Enzyme in Peptide zerstückelt wird und im weiteren diese Peptide in den Bindungstaschen der MHC Klasse II Moleküle an der Oberfläche präsentiert werden [56, 118]. Ob und wie effizient diese MHC/Peptidkomplexe an ruhende T-Zellen präsentiert werden und sie zur Proliferation und Zytokinproduktion bringen, wird unter anderem mit den in Punkt 7.a beschriebenen Assays (MLR, OXMI) gemessen. Um nur die Prozessierfähigkeit zu bestimmen, könnte theoretisch ein direkter Ansatz gewählt werden, nämlich die Messung der spezifischen MHC/Peptidkomplexe auf der Zelloberfläche. Das ist aber praktisch nicht möglich. Es werden deshalb Klone oder Hybridome von T-Zellen herangezogen, die nur einen, genau definierten MHC/Peptidkomplex mit ihren T-Zell-Rezeptoren erkennen und darauf mit Proliferation und/oder Zytokinausschüttung reagieren [47, 49]. Im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen stellen T-Zell-Klone und Hybridome bereits voraktivierte T-Zellen dar. Sie reagieren auf die Präsentation von spezifischen MHC/Peptidkomplexen auf der Oberfläche von unreifen DZ (z.B. frisch isolierte LZ) und reifen DZ (z.B. kultivierten LZ) in gleicher Weise. Diese Reaktion ist nur abhängig von der Menge der gebildeten („prozessierten“) MHC/Peptidkomplexe.

In dieser Arbeit habe ich antigenspezifische T-Zell-Hybridome verwendet. Diese Zellen sind durch Fusion mit Tumorzellen immortalisiert. Ihre Proliferation ist deshalb unabhängig von der antigenspezifischen Stimulation durch APZ. Die Produktion und Sekretion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin 2 jedoch ist streng aktivierungsabhängig. Ich habe das gebildete Interleukin-2 in einem Bioassay mit der Il-2-abhängigen Proliferation einer Indikatorzelllinie (zytotoxischer T-Zell-Klon, CTLL) gemessen.

#### **Methodik:**

Meine DC sind größtenteils aus der Organkultur entnommen. Unterschiedliche Antigene wie Ovalbumin, Myoglobin und Hen-Egg-Lysozyme wurden teilweise schon während der Kultur hinzugefügt, teilweise aber erst im Assay den DC angeboten. Dann wurden die APZ in einer

Verdünnungsreihe in Triplikaten auf einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte ausplattiert (höchste Dosis 3000 APZ/well ) und mit je 50.000-100.000 Hybridomzellen/well versehen (siehe Tab.II.3). In einem Endvolumen von 200µl/well wird der Ansatz für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden 100µl zellfreier Überstand auf eine neue 96-well-Platte übertragen. Diesem Überstand werden je 6.000 IL-2-abhängige CTLL Zellen/well zugegeben (Endvolumen 200 µl/well ) und der Ansatz wieder für 36 h bei 37°C inkubiert. Für 4-6 h wird dann 50µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben (Endkonzentration 148 kBp= 4 µCi/ml; 247,9 G Bq= 6,7 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA). Die weitere Auswertung ist identisch mit der in 7.a beschriebenen.

Tab.II.3

<i>Name des Hybridoms</i>	<b>Spezifität</b>	<b>Peptidspezifität</b>	<b>Restriktion</b>	<b>Quelle</b>
<i>11.3.7</i>	Myoglobin	110-121	I-E <sup>d</sup>	A.Livingstone
<i>Hd-1.AC5</i>	Hen egg Lysozyme	103-120	I-E <sup>d</sup>	P.Jensen/ S.Katz
<i>3DO-54.8</i>	Ovalbumin	323-339	I-A <sup>d</sup>	P.Marrack

Legende: Dr Alexandra Livingstone, Basel Institute for Immunology, Basel, Schweiz  
 Dr. Peter Jensen, Emory University, Atlanta, CA  
 Dr. Philippa Marrack, Howard Hughes Medical Institute, Denver, CO

## III. Das Organkultursystem

### 1.) Einleitung:

#### Ist das Organkultursystem für Studien der Migration geeignet?

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, daß die LZ, die sich in großer Zahl in der Epidermis befinden, emigrieren können. Vor allem die Studien von Larsen und Steinman [82] zeigten, daß die LZ aus Allo- und Iso-Ohrtransplantaten sowie auch in vitro aus Ohrhälften auswandern, und somit die Zahl der LZ in den epidermalen „sheets“ stark abgenommen hat, während die verbleibenden LZ massiv an Größe zunahmten und stärker MHC/Klasse II-positiv wurden.

Im Gegensatz zu den in den „sheets“ verbleibenden Zellen zeigen die ausgewanderten LZ am d1 einen relativ heterogenen Phänotyp, vor allem bei Betrachtung der Marker F4/80 (welcher auf Makrophagen und auf unreifen LZ vorkommt), Fc $\gamma$ RII (CD25) und Interleukin 2 $\alpha$ -Rezeptor (CD25). Die Beobachtung dieser Marker können den Verlauf des Reifungsprozesses der LC sehr anschaulich demonstrieren. Die am d1 aus den Transplantaten gewonnen LZ zeigten schon mehr immunstimulatorische Aktivität für ruhende T-Zellen in OXMI und MLR als frisch isolierte LZ aus normaler Haut, aber geringere immunstimulatorische Aktivität als Milz-DZ. Nach 3 bis 5 Tagen überstieg die Aktivität der ausgewanderten LZ diejenige der Milz-DZ, was ein Hinweis auf die funktionelle Reifung in der Kultur darstellt [82]. Daraus wurde geschlossen, daß die LZ-Reifung in der Epidermis beginnt und während der Migration anhält. Es besteht aber keine Notwendigkeit, daß die Zellen absolut reif in Phänotyp und Funktion sind, um die Haut verlassen zu können.

Nachdem es sehr schwer ist, die LZ auf ihrem Weg in den verschiedenen Entwicklungsstufen in vivo zu beobachten und auch die beobachteten Phänomene zu verifizieren, haben schon Larsen et al. versucht, Ohrhälften auf ein Filterpapier aufliegend in Kulturmedium schwimmen zu lassen. Die Methode hat er von Jenkinson et al.[119] übernommen, welche Thymuszellen für in vitro-Studien präparierten. Larsen und Steinman adaptierten dieses System für Hauttransplantate. Die Organe konnten durch Diffusion der Nährstoffe ins Gewebe überleben. Im Unterschied zu Hauttransplantaten, die lediglich von endogen produzierten Mediatoren beeinflusst wurden, konnte das Organsystem von exogen zugefügten Mediatoren moduliert werden. Im Vergleich mit Hauttransplantaten konnte man sehen, daß die epidermalen „sheets“

aus kultivierten Ohrhälften dieselben phänotypischen Veränderungen zeigten, wenn auch in einem etwas langsameren Zeitverlauf. Mit Hilfe einer neuen Technik wurden auch dermale „sheets“ dargestellt und untersucht. Dort fand man eine ungleichmäßige Verteilung Klasse II-positiver DZ, welche sich am Tag 3 zu Bündeln bzw. Strängen („cords“) vermutlich in den Lymphbahnen sammelten, bevor sie spontan ins Kulturmedium emigrierten. Mein Vorgänger in diesem Labor, Martin Heine, konnte elektronenmikroskopisch zeigen, daß die so auffällig strangartig angeordneten DZ in der Dermis sich eindeutig in Lymphgefäßen befanden, und daß sie - wenigstens zum Teil - aus der Epidermis stammten [120]. Die Gegenwart von Birbeck-Granula legte diesen Schluß nahe.

Diese Tatsachen weisen daraufhin, daß die Organkultur zur genaueren Beobachtung der Migration und Reifung geeignet ist, da die verantwortlichen Mediatoren in loco produziert zu werden scheinen - sonst würde die in vitro-Migration wohl nicht funktionieren.

## **2.)Fragestellung:**

Aufbauend auf den eben erwähnten Vorarbeiten [82, 120] wurden die folgenden konkreten Fragen gestellt. In Erweiterung der Vorarbeiten wurden diese Fragen vorwiegend unter dem Aspekt des zeitlichen Verlaufs studiert. Zu diesem Zweck mußte das Kulturmodell in entscheidenden Punkten modifiziert werden.

1. Ist es mit diesem Organkultursystem möglich, die morphologischen Veränderungen der DZ in Form von Größenzunahme und Verstärkung der Klasse II-Molekül-Expression einerseits, sowie die Abnahme der Zellzahl in epidermalen „sheets“ andererseits, zu reproduzieren und verifizieren?
2. Ist es mit diesem Organkultursystem möglich, die Ansammlung von Klasse II-positiven LZ, also die Cords-Bildung in der Dermis zu bewirken und färberisch darzustellen? Gibt es weitere Möglichkeiten zur Beweisführung, daß die „CORDS“ sich in den Lymphgefäßen befinden und in welchem Reifungszustand sie sich dort befinden?
3. Wie hoch ist in diesem System die Zahl der ins Medium ausgewanderten Zellen?
4. Welche morphologischen und phänotypischen Charakteristika weisen diese hier wiedergefundenen Zellen auf?
5. Ist die Funktionsfähigkeit dieser Zellen noch vorhanden, wenn ja, in welcher Form ist sie charakterisiert?
6. Wie läßt sich das Organkultursystem verändern, damit kinetische Studien besser möglich sind?

### **3.)Versuche/Ergebnisse:**

#### **3.1 In vitro - Kultur von Tag 0 - Tag 3:**

##### **Morphologische Veränderungen der epidermalen LZ in situ**

Schon seit einiger Zeit ist im Innsbrucker Labor diese Organkultur etabliert. Ihre Durchführung wird im Protokoll beschrieben. In der Regel wurden die in meinem Fall ausschließlich verwendeten dorsalen (d.h. knorpelfreien) Ohrhälften nach 1, 2 oder 3 Tagen aus der Kultur entnommen und zur Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“ auf Ammoniumthiozyanat übertragen. Zum Vergleich wurden auch frisch abgeschnittenen Ohren, also Tag 0-„sheets“ hergestellt (siehe Protokoll: Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“).

Diese „sheets“ wurden mit dem monoklonalen Antikörper B21/2 (Klasse II) sowie zur Negativkontrolle mit RB6 (färbt Granulozyten) dreistufig laut Färbeprotokoll mit Immunfluoreszenz gefärbt.

##### **Ergebnis:**

Mit diesem gut färbenden monoklonalen Antikörper B21/2 kann die Abnahme der Zellzahl von Tag 0 - Tag 3 kontinuierlich beobachtet werden. Die verbleibenden LZ werden „ausgezogener“ und größer, und die Zunahme an MHC-class II-Expression kann anhand der Farb- bzw. Fluoreszenz-Intensitätszunahme der Einzelzelle gut erkannt werden (siehe Abbildung 1 a-d: Hier wurde zur Veranschaulichung ein Tag 0-Bild (a) neben einem Tag 1-Bild (b), einem Tag 2-Bild (c) und einem Tag 3-Bild (d) photographiert. Alle Bilder sind gleich lange belichtet (2min) und mit der gleichen Vergrößerung (320x) photographiert und identisch entwickelt).

Es erfolgte eine quantitative Auswertung der LZ-Zahl/mm<sup>2</sup> (siehe Tab.III.1) durch randomisierte Auszählung von mindestens 9 Gesichtsfeldern je „sheet“ mittels eines im Okular integrierten Zählfeldes. Damit kann eine kontinuierliche Abnahme der LZ-Zahl quantitativ beschrieben werden. Es wurden mindestens 3 „sheets“ (und dort jeweils 9 Gesichtsfelder) pro Tagesfraktion ausgezählt.

Tab III.1

	Mittelwert	Std.Abw.	Abnahme in %
d0	794	+/- 92	–
d1	481	+/- 45	-39%
d2	350	+/- 32	-56%
d3	203	+/- 29	-74%

**Legende:**

Mittelwert: Errechnete Durchschnittswert aus 3 ausgezählten „sheets“ je 9 Gesichtsfelder umgerechnet auf Zellzahl pro mm<sup>2</sup>.

Std.Abw.: Standardabweichung

d0,d1,d2,d3: Bezeichnung für die Dauer der bestandenen Kultur aus der die „sheets“ stammen.

**3.2 Akkumulation der DZ in der Dermis:**

- Laut Protokoll wurden auch dermale „sheets“ angefärbt und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt.  
Die Marker NLDC-145, MKD6 und B21/2 konnten mit der Immunfluoreszenz auf dermalen DZ nachgewiesen werden und zeigten jetzt die ungleichmäßige Verteilung der DZ in der Dermis.  
Die Interpretation der Beobachtungen in der Dermis stellte sich als wesentlich diffiziler heraus, da durch deren größere Dicke nie alle Ebenen, und somit auch nie alle DZ gleichzeitig zur Ansicht gelangen. Doch mit einiger Übung und starkem Fokussieren konnten nicht nur einzelne DZ, sondern auch Ansammlungen derer (die sogenannten CORDS [Larsen]) identifiziert werden. In Tag 0-„sheets“, die zum Vergleich angefertigt worden waren, konnten keine CORDS lokalisiert werden, während in allen anderen, also Tag 1, 2 und 3 einige Cords in unterschiedlicher Stärke, Dicke und Ausprägung vorzufinden waren, die sich kurze Strecken mittels Fokussieren verfolgen ließen. (Abb.2,3)
- Aufgrund der Annahme, daß die sich in den Cords befindenen DZ in ihrem Reifungsprozeß schon weit fortgeschrittener sein müßten, versuchte ich eine differenzierte Darstellung ausschließlich reifer DZ in den Cords mit Hilfe des Markers 2A1 in der Peroxidasefärbung. Das vom mAk 2A1 erkannte Molekül wird in reifen DZ, in geringen Maße in B-Zellen, nicht aber in unreifen DZ, wie z.B. frisch isolierten LZ oder unreifen Knochenmarks-DZ exprimiert [56]. Das typische intrazelluläre 2A1-Färbemuster zeigte sich nur in sehr

wenigen Zellen. Diese Zellen waren auffällig strangartig angeordnet, was darauf schließen läßt, daß es sich um DZ in „CORDS“ handelte. Das läßt umgekehrt vermuten, daß ein großer Teil der in der Dermis gelegenen DZ noch unreif ist (d.h., die 2A1-negativen Zellen), daß sie also wahrscheinlich eine unterstützende Funktion zur Barrierebildung durch die epidermalen DZ haben, und daß sie sich erst nach begonnener Abwanderung durch die Lymphgefäße dort als reifere DZ sammeln und zeigen (Abb.4).

- Theoretisch bestünde die Möglichkeit, daß sich diese „Zellhaufen“ (CORDS) auch in den Blutgefäßen befinden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen meines Vorgängers M. Heine [120] haben Ansammlungen von DZ in Lymphgefäßen eindeutig demonstriert; Die haben aber CORDS in Blutgefäßen nicht völlig ausgeschlossen.

Nach Voruntersuchungen, in denen sich zeigte, daß die Blutgefäße den Marker ICAM-1 (CD 54) sehr stark exprimierten, strebte ich eine Doppelfärbung an, um Blutgefäße von Lymphgefäßen bzw. Cords zu differenzieren. Dazu färbte ich vorerst die dermalen „sheets“ mit anti-ICAM-1 und Texas-Red dreistufig (laut Protokoll). Anschließend blockte ich mögliche freie Bindungsstellen, indem ich die „sheets“ 30 Minuten mit Ratten-Immunglobulin inkubierte. Mit einem direkt FITC-gekoppelten anti-MHC-Klasse II monoklonalen Antikörper (MKD6, Pharmingen, San Diego, CA) inkubierte ich eine weitere Nacht (16 h) bei 4°C die „sheets“, um sie erst jetzt, nach einem weiteren Waschvorgang in PBS/BSA, mit Eindeckmedium einzubetten und im Fluoreszenzmikroskop zu beurteilen.

Hierbei beobachtete ich eine deutlich rote Anfärbung der ICAM-1-positiven Gefäßaufzweigungen, während die MHC/Klasse II positiven, zum Teil in Strängen angeordneten DZ sich als deutlich apfelgrüne Strukturen von den roten Gefäßen abhoben und eine völlig verschiedene Verlaufsrichtung einnahmen (Abb.5,6). In keinem der Präparate fand ich eine Überlappung von ICAM-1-positiven Gefäßen und CORDS. Eine ICAM-1 Expression auf den DZ in den CORDS - so wie man es von reifen DZ erwarten könnte [86]- konnte ich nicht beobachten. Möglicherweise ist die Stärke der Expression zu gering, um mit der hier verwendeten Methodik erkannt werden zu können.

So gelang es mir nachzuweisen, daß sich die Cords von den Blutgefäßen unterschieden, und somit die Aussage gerechtfertigt ist, daß sich die Cords nicht in den Blut-, sondern in den Lymphgefäßen zeigten.

### 3.3 Ins Kulturmedium ausgewanderte Zellen

Für jeden Ansatz habe ich in einer 24-well Gewebekulturplatte je eine dorsale Ohrhälfte pro well auf 1,5 ml Kulturmedium aufgelegt. Nach drei Tagen habe ich die Ohrhälften entnommen, den Inhalt von je 6 wells in einem Polypropylenröhrchen gepoolt und abzentrifugiert (siehe Protokoll). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 300 - 500µl resuspendiert und sofort im Hämozytometer nach Trypanblaufärbung gezählt. Hier zählte ich die deutlich durch ihre „veils“ erkennbaren DZ neben den nichtdendritischen, aber viablen Zellen (Erythrozyten, Lymphozyten, Makrophagen, einzelne Keratinozyten) und den toten Zellen. Tabelle III.2 zeigt die auf eine Ohrhälfte bezogenen Zahlen von Gesamtzellen und von den darin enthaltenen DZ.

**Tab.III.2: Absolute Zahlen der innerhalb von 3 Tagen aus einer dorsalen Ohrhälfte ausgewanderten Zellen**

<b>Balb/c</b>			
	<b>Ges.<sup>1</sup></b>	<b>DZ<sup>2</sup></b>	<b>%DZ<sup>3</sup></b>
Exp. 1	38.400	14.700	<b>38</b>
Exp. 2	34.900	12.000	<b>34</b>
Exp. 3	48.000	11.900	<b>25</b>
Exp. 4	36.100	11.700	<b>32</b>
Exp. 5	56.300	15.800	<b>28</b>
Exp. 6	31.700	12.200	<b>38</b>
Exp. 7	31.200	10.700	<b>34</b>
Exp. 8	50.900	16.100	<b>32</b>
Exp. 9	27.300	7.000	<b>26</b>
Exp. 10	28.900	7.000	<b>24</b>
Durchschnitt	38.370	11.910	<b>31</b>

<b>C3H</b>			
	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	17.900	6.200	<b>35</b>

Legende: 1 Gesamtzahl der viablen Zellen pro well/Ohrhälfte  
 2 Gesamtzahl der dendritischen Zellen pro well/Ohrhälfte  
 3 Prozentsatz von DZ bezogen auf alle viablen Zellen

Obwohl die Schwankungen der Zellzahlen insgesamt von Versuch zu Versuch recht hoch sind, kann man trotzdem gut erkennen, daß nur rund 1/3 der vorhandenen Zellen als DZ klassifiziert werden konnten. Die starken Schwankungen der erhaltenen Zellzahlen sind wohl auf Alter und Größe der Mäuse (-ohren) zurückzuführen, andererseits aber fiel mir auch ein Zusammenhang mit der Trockenzeit auf, die nach der Desinfektion in Alkohol notwendig ist, damit die Ohrhälften aufschwimmen und nicht untergehen.

In einigen gezielten Versuchen (siehe Tab.III.3) konnte ich demonstrieren, daß eine Verlängerung der Trockenzeit eine Verringerung der erhaltenen Zellzahl bewirkte. Somit verzichtete ich in weiteren Versuchen auf eine längere Trockenzeit und war um eine Weiterverarbeitung nach so kurzer Zeit wie möglich (ca. 15 Minuten) bemüht.

**Tab.III.3: Vergleich der Gesamtzellzahlen und der DZ-Zahlen nach unterschiedlichen Trockenzeiten**

Balb/c	10 min		30 min	
	Ges. <sup>1</sup>	DZ <sup>2</sup>	Ges. <sup>1</sup>	DZ <sup>2</sup>
Exp. 1	38.400	14.700	30.100	9.300
Exp. 2	30.100	12.500	26.000	8.400
Exp. 3	56.300	15.800	28.600	6.600
<b>Durchschnitt</b>	<b>41.600</b>	<b>14.333</b>	<b>28.233</b>	<b>8.100</b>

- Legende:
1. Gesamtzahl der viablen Zellen pro well/Ohrhälfte
  2. Gesamtzahl der dendritischen Zellen pro well/Ohrhälfte
  3. 10 min, 30 min: Angabe der Trockenzeit nach der Desinfektion.

### **3.4 Morphologische und phänotypische Charakteristika der ausgewanderten Zellen**

Die am d3 abgesammelten DZ sind sehr leicht als solche im Hämocytopometer zu erkennen, da sie relativ groß sind und die typischen „veils“ in starker Ausprägung zeigen. Die Färbung von Zytopräparaten mit verschiedenen mAk ergab ein Muster, welches für reife DZ typisch ist [5]: starke MHC/Klasse II Expression (B21/2, NLDC-154), Expression von 2A1 [56] und M342 [9] fehlende Expression des Makrophagenmarkers F4/80, des Granulozytenmarkers RB6, sowie von T- und B-Zell-Markern. (Abb. 7)

### **3.5 Funktionelle Eigenschaften der DZ**

Die innerhalb von 3 Tagen ins Medium ausgewanderten DZ entsprachen in ihrer immunstimulatorischen Kapazität einer typischen reifen DZ [7, 34]. Sie stimulieren ruhende T-Zellen in einer oxidativen Mitogenese gleich stark wie vergleichbare Zahlen von kultivierten LZ.

### **3.6 Modifikation des Organkultursystems**

#### **a) Das modifizierte System:**

Mit den bisherigen Daten kann ich im wesentlichen die Ergebnisse meines Vorgängers bestätigen. Dieses System ermöglicht aber keine differenzierte Beurteilung der an den verschiedenen Tagen ausgewanderten Zellen. Diese Tatsache einerseits, sowie das innerhalb weniger Stunden gelb verfärbte, also verbrauchte Medium andererseits, veranlaßte mich zu einer Modifikation des Systems. Hierzu transferierte ich die Ohrhälften täglich auf frisches Medium, während ich das alte Medium absammelte, poolte, zentrifugierte und die Zellen im Hämocytopometer auszählte.

Hierbei kamen einige interessante Aspekte zum Vorschein:

1. Die Zahl der von d0-d1 ausgewanderten Zellen ist schon relativ hoch, wobei die DZ aber aufgrund ihrer Unreife im Hämocytopometer relativ schwer zu erkennen sind. Die morphologischen Merkmale insbesondere die „veils“ sind also erst geringgradig ausgeprägt.
2. Die von d1-d2 ausgewanderten Zellen lassen ihre morphologischen Merkmale gut erkennen und die Zellzahl läßt sich dadurch leicht quantitativ erheben. Hierbei fiel auf, daß

die Anzahl der DZ in Relation zur Anzahl der Nicht-DZ deutlich gestiegen war, daß die Anreicherung der DZ sich also erhöhte. Auch diese Beobachtung ist ein eindeutiger Hinweis auf die aktive Auswanderung der DZ. Theoretisch könnten die Zellen ja auch durch Zerfall des Organs in das Medium gelangen.

3. Die Anreicherung stieg von d2-d3 weiter deutlich an, sodaß nunmehr fast ausschließlich DZ in der Zählkammer zu finden waren. In neun verschiedenen Experimenten betrug die Zahl der von d0-d1 ausgewanderten Gesamtzellen 25.420 (+/- 4.425); diese Zahl sank von d1-d2 auf 20.680 (+/- 4.181) und weiter von d2-d3 auf 15.880 (+/- 5.201). Umgekehrt jedoch stieg der Prozentsatz der in diesen Populationen enthaltenen DZ an: 33% (+/- 9%) von d0-d1, 52% (+/- 6%) von d1-d2 und 68% (+/- 4%) von d2-d3. Die Experimente sind im einzelnen in Tab.III.4 angeführt. Zur besseren Veranschaulichung werden die Versuche in der Graphik III.1 und III.2 zusammengefaßt.

Tab.III.4:

**Anreicherung der DZ im Verlauf der neuen Organkultur**

<b>Balb/c</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	d0-d1	32.200	7.400	23
	d1-d2	14.300	6.700	47
	d2-d3	7.100	5.000	70

<b>Balb/c</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	d0-d1	23.000	5.700	25
	d1-d2	24.600	11.400	46
	d2-d3	17.800	12.000	67

<b>Balb/c</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 3	d0-d1	24.200	9.500	39
	d1-d2	18.700	10.400	56
	d2-d3	19.900	12.300	62

<b>Balb/c</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 4	d0-d1	27.100	9.400	<b>35</b>
	d1-d2	23.100	14.100	<b>61</b>
	d2-d3	19.200	14.100	<b>73</b>

<b>Balb/c</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 5	d0-d1	20.600	8.800	<b>43</b>
	d1-d2	22.700	11.000	<b>48</b>
	d2-d3	15.400	10.100	<b>66</b>

<b>Balb/c in serumfreiem Medium</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 6	d0-d1	11.100	4.300	<b>39</b>
	d1-d2	14.900	7.800	<b>52</b>
	d2-d3	8.300	5.000	<b>60</b>

<b>C3H</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 7	d0-d1	13.200	5.300	<b>40</b>
	d1-d2	15.000	9.800	<b>65</b>
	d2-d3	9.200	6.200	<b>67</b>

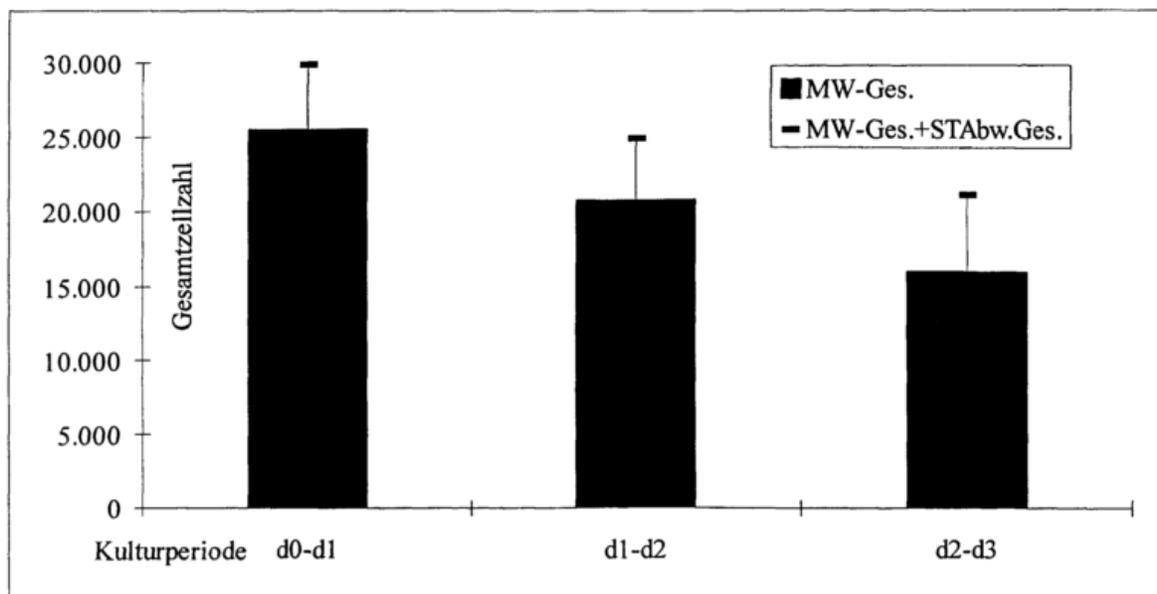
<b>C3H</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 8	d0-d1	8.600	4.400	<b>51</b>
	d1-d2	10.100	5.700	<b>56</b>
	d2-d3	9.400	5.700	<b>61</b>

<b>LPS-resistente Mäuse</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 9	d0-d1	8.600	3.200	<b>37</b>
	d1-d2	9.600	5.700	<b>59</b>
	d2-d3	13.600	8.700	<b>64</b>

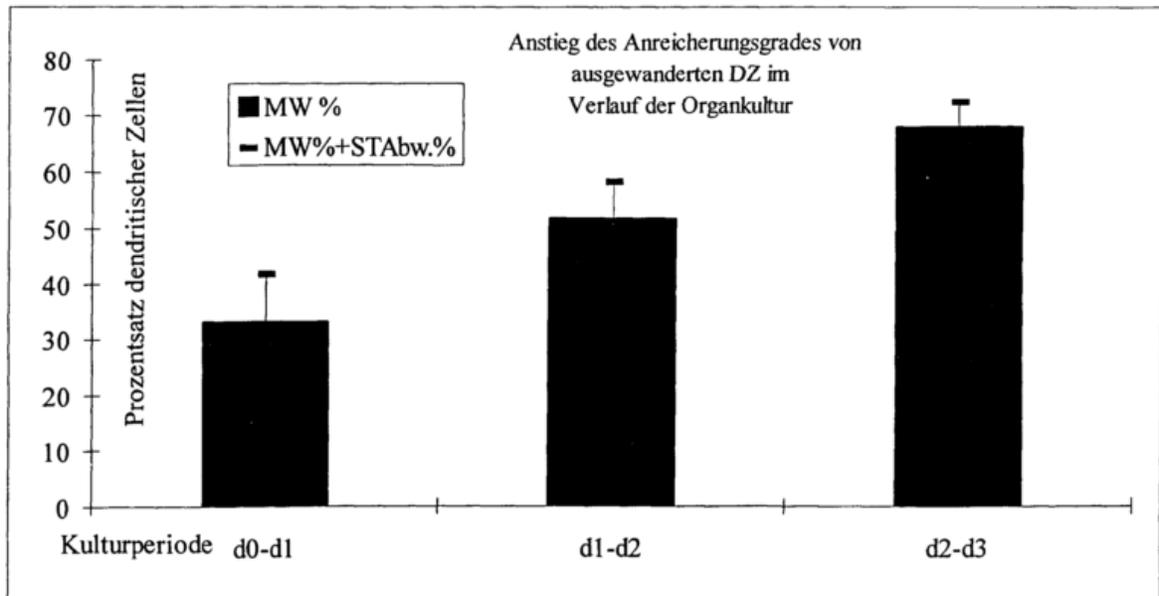
Legende: d0-d1: entspricht den von Tag0-Tag1 ausgewanderten Zellen  
d1-d2: entspricht den von Tag1-Tag2 ausgewanderten Zellen  
d2-d3: entspricht den von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen  
Ges.: Gesamtzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten Zellen.  
DZ : Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl.

### Graphik III.1:

Graphische Darstellung der Verhältnisse der Gesamtzahlen im Verlauf der Organkultur



Graphik III.2:



Anhand dieser Versuche läßt sich die fortschreitende Anreicherung der DZ leicht erkennen: Der Anteil der ausgewanderten DZ an der Gesamtzahl der Zellen beträgt am Tag 1 etwa 30%, am Tag 2 etwa 50%, während er am Tag 3 auf etwa 70% ansteigt. Das läßt sich auch immunzytochemisch anhand einer MHC-Klasse II Färbung auf Zytozentrifugenpräparaten demonstrieren (Abb. 8).

Ein weiteres Phänomen läßt sich nach der Färbung mit dem 2A1-Antikörper (der nur reife DZ intrazellulär färbt) gut demonstrieren, nämlich daß es außer einer Anreicherung auch zu einer fortschreitenden Reifung kommt. Schon das morphologische Erscheinungsbild der DZ weist auf die Reifung hin, doch auch die stärkere und komprimiertere Expression des 2A1-Antigens auf d3 DZ im Vergleich zu d1 DZ (Abb.9) demonstriert diesen Effekt.

Diese Ergebnisse werfen natürlich die Frage auf, wie lange sich dieses System fortsetzen läßt und wie sich die Zellzahl dann weiterhin verhält. Tabelle III.5 demonstriert das Verhalten der dendritischen Zellen und der Gesamtzellzahl in einem erweiterten Zeitverlauf (auch Graphik III.3). Aus diesen Zählungen läßt sich erkennen, daß die Anreicherung nicht weiter ansteigt, sondern von d3-d4-d5 ein Plateau bei etwa 70% erreicht, welches ca. ab Tag 6 wieder abfällt und langsam in einen scheinbaren Zerfall des Kulturorgans mündet. Dieser wird am Tag 8 auch in der Zählkammer deutlich sichtbar durch einen massiven Anstieg der toten Zellen. Weiters konnte etwa ab Tag 2 die Ausbildung von „Clusters“, zum größten Teil bestehend aus DZ, beobachtet werden. Auch diese „Clusterbildung“ erreichte einen Höhepunkt bei Tag 6 -

Tag 7, ist dann aber aufgrund des Zellzerfalls nicht weiter verfolgbar. Diese Art der homotypischen Zellaggregation kann bei reifen DZ aller Art typischerweise immer wieder beobachtet werden.

### b) Verhalten der Auswanderung in einem verlängerten Zeitraum

Tab.III.5

<b>Zeitverlauf</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	d0-d1	24.300	7.200	30
	d1-d2	29.100	14.400	49
	d2-d3	18.500	11.300	61
	d3-d4	19.700	12.300	62
	d4-d5	14.300	9.300	65
	d5-d6	18.400	8.400	46
	d6-d7	19.400	7.400	38
	d7-d8	12.100	5.000	41
	d8-d9	12.000	2.800	23

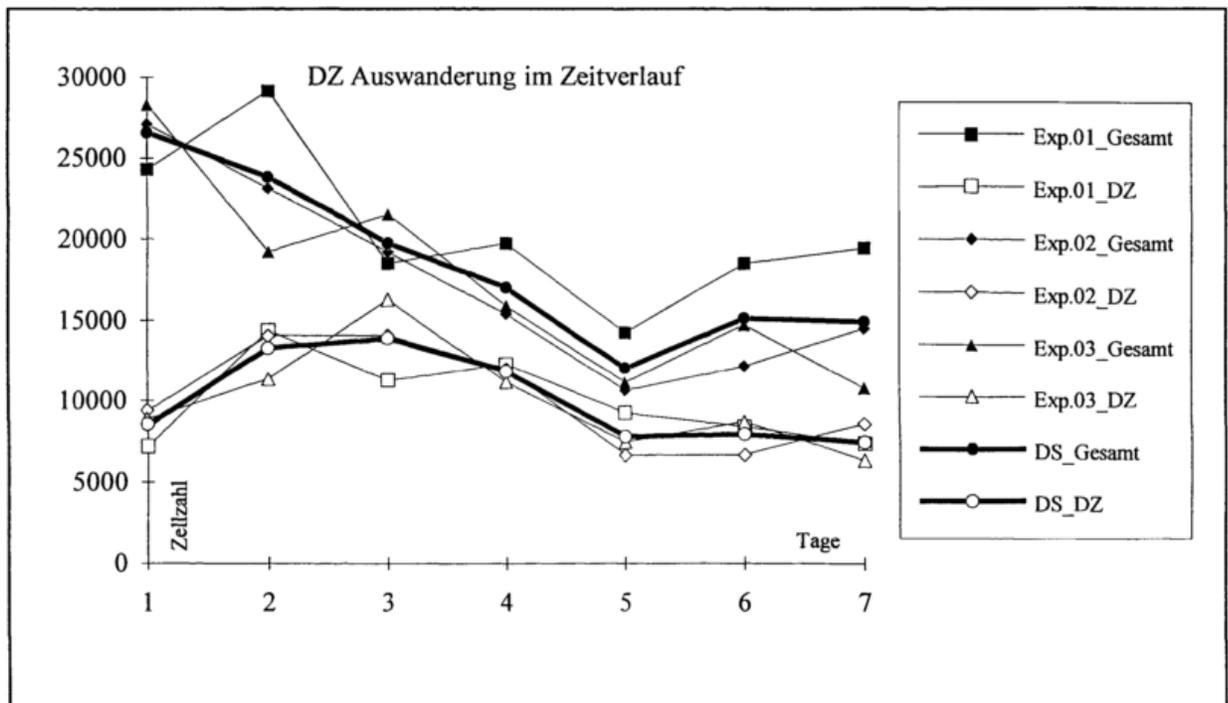
<b>Zeitverlauf</b>				
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	d0-d1	27.100	9.400	35
	d1-d2	23.100	14.100	61
	d2-d3	19.200	14.100	73
	d3-d4	15.400	12.000	78
	d4-d5	10.700	6.700	63
	d5-d6	12.100	6.700	55
	d6-d7	14.500	8.600	59
	d7-d8	11.100	4.800	43
	d8-d9	10.300	4.900	48
	d9-d10	15.400	3.700	24
	d10-d11	15.000	2.900	19
	d11-d13	20.400	2.400	12

Zeitverlauf				
		Ges.	DZ	%DZ
Exp.3	d0-d1	28.300	8.900	31
	d1-d2	19.200	11.400	59
	d2-d3	21.500	16.300	76
	d3-d4	15.900	11.200	70
	d4-d5	11.200	7.500	67
	d5-d6	14.700	8.700	59
	d6-d7	10.800	6.400	59

Legende: d0-d1: entspricht den von Tag0-Tag1 ausgewanderten Zellen  
 d1-d2: entspricht den von Tag1-Tag2 ausgewanderten Zellen  
 d2-d3: entspricht den von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen  
 Ges.: Gesamtzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten Zellen.  
 DZ : Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
 %DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

Graphik III.3:

Graphische Darstellung des Verhaltens von Gesamtzellen zu DZ im Verlauf einer Woche  
 (Graphische Darstellung der 3 oben angeführten Versuche):



Legende: Gesamt: Alle pro Experiment und Tag ausgezählten Zellen  
 DZ: Anzahl der pro Tag ausgewanderten dendritischen Zellen  
 DS: Errechneter Durchschnitt aus allen 3 Experimenten

**c) Entwicklung und Reifung kutaner DZ während der Organkultur**

*Aus diesen Versuchen ergab sich die Frage, ob der Reifungsprozeß zu einem bestimmten Zeitpunkt beginne und die Zellen unterschiedlich lange Zeit zur Auswanderung benötigten oder ob nach jedem Transferierungsschritt neue LZ zur Auswanderung und Reifung stimuliert wurden.*

Dies würde heißen, daß die Tag 2- bis Tag 3-Zellen den Tag 1- bis Tag 2-Zellen entsprechen müßten. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe von funktionellen Tests (OXMI, MLR, siehe Protokoll) untersucht.

Hier wurden die funktionellen Fähigkeiten und somit auch der Reifungszustand der einzelnen, mit diesem System gewonnenen Zellpopulationen ermittelt durch Messung ihrer Fähigkeit zur Stimulation ruhender T-Lymphozyten (siehe Kap. II.7 a). Diese Fähigkeit wurde in mehreren Versuchen ausgetestet, wobei in Tabelle III.6 ein Versuch exemplarisch für alle dargestellt ist. Daraus läßt sich erkennen, daß offensichtlich der Großteil der LZ bereits zum Zeitpunkt des Kulturbeginns schon ihren Stimulus zur Reifung erhalten und sie lediglich unterschiedlich viel Zeit zur Auswanderung beanspruchen.

Dies läßt sich daraus ersehen, daß alle d3-Zellen (ganz egal ob sie erst von d2-d3 aus einer Ohrhälfte ausgewandert sind oder ob sie von d1-d2 ausgewandert sind und bis d3 weiterkultiviert wurden) gute Stimulatoren für ruhende T-Zellen sind, während die stimulatorische Aktivität der d2-Zellen (ganz egal ob sie von d1-d2 ausgewandert sind oder ob sie von d0-d1 ausgewandert sind und bis d2 weiterkultiviert wurden) schon deutlich geringer ist. Die von d0-d1 ausgewanderten Zellen entsprechen relativ frischen DZ, deren stimulatorische Aktivität an ruhenden T-Lymphozyten noch recht gering ausgeprägt ist.

Tab.III.6:

Entwicklung/Reifung der immunstimulatorischen Kapazität kutaner DZ während der Organkultur

<b>Oxidative Mitogenese</b>				
<b>Zeitpunkt der Auswanderung und weitere Kultur</b>	<b>3.000 DZ/well</b>	<b>1.000 DZ/well</b>	<b>300 DZ/well</b>	<b>100 DZ/well</b>
ausgewandert: d2-d3	115.0000	84.000	30.300	12.900
ausgewandert: d1-d2 weiterkultiviert von d2-d3	162.400	87.700	37.200	15.800
ausgewandert: d1-d2	99.400	49.600	20.100	9.300
ausgewandert: d0-d1 weiterkultiviert von d1-d2	68.900	27.800	12.600	5.900
ausgewandert: d0-d1	41.100	21.900	8.700	4.800

Legende: Die verschiedenen Arten von DZ aus Ohrhälfen von Balb/c Mäusen wurden in verschiedenen Dosen mit 300.000 T-Zellen 24 h inkubiert. Zur Messung der Proliferation wurde nun [<sup>3</sup>H] Thymidin zugesetzt und dessen Inkorporation nach weiteren 14 h gemessen. Die Proliferation der T-Zellen allein, d.h. ohne zugefügte DZ war < 1000 cpm.

Ein weiterer essentieller Aspekt der funktionellen Kapazität liegt in der Fähigkeit der LZ, Antigene zu prozessieren. Aus früheren Untersuchungen weiß man, daß frische (= unreife) LZ gut Antigen präsentieren können, aber schlechte T-Zell-Stimulatoren sind, während kultivierte (= reife) LZ etwa Milz-DZ entsprechen und somit kaum mehr Antigen präsentieren können, aber gute Stimulatoren für ruhende T-Zellen darstellen [7, 34, 49]. Diese Messung der Fähigkeit zum Prozessieren erfolgt mittels antigen-spezifischer T-Zell Hybridome, die proportional zur Effizienz des Prozessierens aktiviert werden. Als Maß für die Aktivierung der Hybridomzellen wird das von ihnen sezernierte IL-2 im Bioassay bestimmt (siehe Kap.II.7 b).

Die Entwicklung des Prozessiervermögens der kutanen DZ verlief nicht -wie eigentlich erwartet- reziprok zur Reifung des Stimulationsvermögens für ruhende T-Zellen. Wie die Tab.III.7A exemplarisch zeigt, nehmen die ausgewanderten DZ eine Zwischenstellung ein: Sie prozessieren bei weitem nicht so effizient wie parallel mitgeführte frisch isolierte epidermale

Langerhanszellen; Sie haben das Prozessiervermögen aber nicht so stark herabreguliert wie kultivierte LZ. Auch nimmt das Prozessiervermögen mit zunehmender Kulturdauer nicht in dem Maße ab (Tab.III.7A), wie das T-Zell Stimulationsvermögen zunimmt (Tab.III.7B).

Tab.III.7:

Messung der Prozessierung von nativen Proteinantigen mit dem spezifischen Hybridom Hd-1.AC5

<b>A Antigen-spezifischer T-Zell Hybridom Assay</b>						
<b>Zeitpunkt der Auswanderung + weitere Kultur</b>	<b>Höchstdosis</b>					
	10.000	3.000	1.000	300	100	30
	DZ/well	DZ/well	DZ/well	DZ/well	DZ/well	DZ/well
ausgewandert: <b>d2-d3</b>	33.100	29.200	22.400	15.700	5.800	3.100
ausgewandert: <b>d1-d2</b>	31.100	31.600	19.500	10.900	7.500	3.400
ausgewandert: <b>d0-d1</b>	6.100	11.200	8.900	4.700	3.200	2.200
frisch isolierte LZ: <b>d0</b>	65.900	61.700	52.700	45.200	32.400	7.000
kultivierte LZ: <b>d3</b>	2.500	2.600	2.800	3.200	2.900	2.100

<b>B Oxidative Mitogenese</b>						
<b>Zeitpunkt der Auswanderung + weitere Kultur</b>	<b>Höchsddosis</b>					
	10.000 DZ/well	3.000 DZ/well	1.000 DZ/well	300 DZ/well	100 DZ/well	30 DZ/well
ausgewandert: d2-d3	–	37.000	20.400	6.900	2.800	–
ausgewandert: d1-d2	–	41.000	16.600	7.300	3.700	–
ausgewandert: d0-d1	–	9.100	5.700	2.500	1.400	–
frisch isolierte LZ: d0	–	3.000	2.200	1.700	500	–
kultivierte LZ: d3	–	33.700	20.100	8.200	4.400	–

Legende A: Frisch isolierte und mittels anti-Thy-1 und Komplement-Behandlung auf ca. 10% angereicherte epidermale LZ sowie 3d kultivierte und mittels Dichtentrennung auf bovinen Serum-Albumin-Säulen auf ca. 60-70% angereicherte LZ von Balb/c-Mäusen und die verschiedenen Arten von ausgewandertern DZ wurden in verschiedenen Dosen mit 50.000 Hybridomzellen in Gegenwart oder Abwesenheit des nativen Antigens inkubiert. Als Antigen wurde Lysozym aus dem Hühnerei (HEL, hen egg lysozyme) in einer Endkonzentration von 6,8µM, entsprechend 100µg/ml eingesetzt. Nach 24 h wurde der IL-2 Gehalt in den Überständen mittels des CTLL-Bioassays bestimmt. Background-Proliferation der CCTll-Zellen war 2.700 cpm. In allen Ansätzen ohne Antigen kames zu keiner IL-2 Sekretion des Hybridoms; diese Werte sind nicht angeführt.

Legende B: Die gleichen Zellen wurden in parallelen Mikrotiterplatten mit 300.000 periodierten T-Zellen pro well für 24h inkubiert. Zur Messung der Proliferation wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt und dessen Inkorporation nach weiteren 14h gemessen. Die Prolifration der T-Zell Population alleine, d.h.ohne zugefügte DZ war 1.900 cpm.

#### **4.)Diskussion:**

Das Organkulturmodell scheint ein gutes System zur Imitation der *in vivo* Vorgänge darzustellen. Durch das Abschneiden der Ohren oder durch einen der anderen Arbeitsvorgänge erfolgt ein Stimulus zur Migration der Langerhanszellen und der dermalen dendritischen Zellen. Dieser - noch unbekannte und im weiteren untersuchte - Stimulus entspricht wahrscheinlich dem durch Antigen ausgelösten Stimulus. Anhand dieses Modells lassen sich quantitative und qualitative Aussagen über das Verhalten des kutanen Systems der dendritischen Zellen machen.

**Organkulturmodell nach Larsen et al.** In dem von meinem Vorgänger [120] und aus der Literatur [82] übernommenen Organkulturmodell muriner Haut konnte ich die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Befunde bestätigen. In situ zeigte sich nach drei Tagen Kultur eine Abnahme der Langerhanszellen am epidermalen „sheet“ um ca. drei Viertel des Normalwertes sowie eine auffallende Zunahme der LZ-Größe und der Intensität der MHC-Klasse II Expression. In der Dermis traten Ansammlungen von DZ in strangförmigen Formationen (CORDS) auf. Im Verlauf von 3 Tagen wandern reproduzierbar gemischte Zellpopulationen aus, die zwischen 7.000 und 16.000 (Mittelwert 11.900) DZ pro Ohrhälfte enthielten. Diese DZ zeichneten sich durch typische segelförmige bewegliche Fortsätze, durch hohe MHC-Klasse II Expression und durch eine starke Stimulationsfähigkeit für ruhende T-Zellen aus.

In Erweiterung dieser Studien konnte ich in diesem Modell zwei zusätzliche Befunde erheben. Erstens zeigte ich immunhistochemisch durch eine Doppelfärbung mit mAk gegen ICAM-1 (als Blutgefäßmarker) und MHC-Klasse II (als DZ-Marker), daß sich keine der zahlreichen strangförmigen Ansammlungen von DZ in der Dermis (CORDS) in Blutgefäßen befinden. Das komplementiert die Daten von Heine et al. [120], die elektronenmikroskopisch die Lokalisation von DZ in den Lymphgefäßen demonstriert hatten.

Zweitens konnte ich zeigen, daß die DZ, die sich in den CORDS befinden, immunologisch reifen DZ entsprechen. Ich stellte das immunhistochemisch an dermalen „sheets“ mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der in reifen, nicht aber in unreifen DZ exprimiert wird, fest.

**Methodische Weiterentwicklung des Organkulturmodells.** Bisher geschah die Analyse der aus der Organkultur ausgewanderten Zellen mit den Populationen, die sich nach einem, zwei

oder 3 Tagen im Kulturmedium angesammelt hatten und die also eine Mischpopulation aus früh und spät ausgewanderten Zellen darstellen [82, 121]. Um die Vorgänge während der im Regelfall dreitägigen Kulturdauer zeitlich besser aufgliedern zu können, übertrug ich die Ohrhälften täglich auf frisches Kulturmedium. So konnte ich DZ gewinnen, die während eines genau definierten Zeitraumes ausgewandert waren.

Meine Experimente in diesem Modell zielten auf die Frage ab, wann der Reifungsprozeß der DZ beginnt. Eine Möglichkeit wäre, daß alle Zellen beim initialen Stimulus bzw. Trauma, nämlich dem Abschneiden der Ohren den Anstoß zur Reifung bekommen und nur verschieden lange (ein bis drei Tage) brauchen, bis sie aus der Haut ins Kulturmedium heraus "gekrabbelt" sind. Eine alternative Möglichkeit wäre, daß kontinuierlich während der gesamten Kulturdauer DZ zu reifen beginnen. Die Daten von Larsen et al. [82], Heine et al. [120] und mir zeigen, daß praktisch alle LZ, die in der Epidermis nach einem, zwei oder drei Tagen der Kultur noch vorhanden sind, eine sehr starke MHC-Klasse II Expression zeigen und vergrößert sind. Dies deutet auf eine Reifung in situ hin. Aiba et al. [59] präparierten LZ aus der Epidermis mittels Trypsinisierung zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von Kontaktallergenen. Immunhistochemisch findet man dabei ein ähnliches Bild wie bei der Organkultur: Abnahme der epidermalen LZ, MHC-Klasse II Anstieg und Vergrößerung der verbleibenden LZ sowie Bildung von CORDS in der Dermis [120]. Funktionell waren die nach Kontaktallergen noch in der Epidermis befindlichen LZ stärker als Kontroll-LZ aus unbehandelter Epidermis. Das spricht ebenfalls für eine Reifung bereits in situ. Meine Daten unterstützen und differenzieren diese Schlußfolgerungen. Ich fand, daß DZ, die im Zeitraum von Kulturbeginn bis zum Tag 1 ausgewandert waren erstens noch nicht die voll ausgeprägte segelartige („veiled“) Morphologie hatten; zweitens, daß sie das für reife DZ typische intrazelluläre Molekül 2A1 [54, 56] noch nicht oder erst schwach exprimiert hatten; und drittens, daß sie noch recht schwache Stimulatoren ruhender T-Zellen in der oxidativen Mitogenese waren. Sie waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig gereift. Im Gegensatz dazu waren von Tag 2 auf Tag 3 ausgewanderte DZ typisch segelartig, massiv 2A1-positiv und potent im T Zell Stimulationsassay. Nun entsprachen sie kultivierten LZ [7, 34, 49]. Ich schließe aus diesen Daten, daß die Reifung im Organkultursystem, so wie bei der Suspensionskultur von Epidermalzellen, zwei bis drei Tage dauert. Die Dauer der Auswanderung jedoch ist unterschiedlich. Es scheint, daß alle kutanen DZ den Reifungsstimulus gleichzeitig zu Beginn der Kultur erhalten. Den „Befehl zum Abmarsch“ aus dem kutanen Gewebe erhalten sie jedoch nicht gleichzeitig. Entgegen den eben

geschilderten morphologischen, phänotypischen und funktionellen Daten zur Reifung kutaner DZ stehen die Befunde über die Fähigkeit dieser DZ zum *Prozessieren von nativen Proteinantigenen*. Mit drei verschiedenen antigenspezifischen T Zell Hybridomen konnte ich beobachten, daß das Prozessiervermögen nicht so gut entwickelt ist, wie bei den bekanntermaßen "besten Prozessoren", nämlich frisch isolierten epidermalen LZ. Unerwartet war aber, daß die Hybridomzellen mit zunehmender Zeit der DZ in Kultur, d.h. mit zunehmender Reifung, relativ besser stimuliert wurden. Im prototypischen experimentellen System der epidermalen Langerhanszellen ist es umgekehrt: Mit zunehmender Reifung verlieren bzw. reduzieren die LZ die Prozessierfähigkeit [49]. Das wurde auch für DZ aus der Milz gezeigt. Es ist also anzunehmen, daß die Grundzüge des Reifungsvorgangs für DZ aus allen Geweben gleich sind. *Spekulativ könnte das beobachtete Phänomen folgendermaßen erklärt werden:* Im Zuge der DZ Reifung in meinem Organkulturmodell wird in einem ersten Schritt - vermutlich noch im Gewebe - das Prozessiervermögen verringert. Dann erst kommt es zur Ausbildung von Zytoplasmaschleiern, zur Expression des 2A1 Moleküls und zur Hochregulierung der für die Stimulation ruhender T Zellen notwendigen Oberflächenmoleküle. Kutane DZ, abgesammelt am Tag 1, Tag 2 oder am Tag 3 hätten demzufolge nur noch eine geringe, residuale Prozessierkapazität. Die wenigen immunogenen Peptid/MHC Komplexe, die dabei entstehen, würden aber umso effizienter an das Hybridom präsentiert werden, je reifer die DZ ist. Das könnte eine steigende Stimulation der Hybridomzellen bei unverändert niedrigem Prozessiervermögen der DZ erklären. *Eine weitere Möglichkeit* könnte sein, daß erst mit fortschreitender Kulturdauer - vermutlich passiv - unreife, und somit gut prozessierende DZ sich aus dem Gewebsverband lösen und die DZ Population "kontaminieren". Solche (noch) nicht gereiften DZ ("Nachzügler") in Populationen von reifen DZ wurden von Koch et al. [75] beschrieben und für die residuale Prozessierkapazität von Populationen kultivierter LZ verantwortlich gemacht. In dem von mir verwendeten äußerst sensitiven Read-Out System mit peptidspezifischen Hybridomen können sehr wenige (<100) aktive Zellen eine deutliche Antwort auslösen. Diese Frage könnte durch detaillierte immunhistochemische Analysen mit monoklonalen Antikörpern, welche Moleküle erkennen, die für das Prozessieren entscheidend sind, angegangen werden. Die MHC-Klasse II-assoziierte invariante Polypeptidkette wird in frischen (prozessierenden) LZ exprimiert, in kultivierten (nicht prozessierenden) LZ aber nicht [46-48]. Antikörper gegen dieses Molekül könnten also Aufschlüsse geben. *Alternativ dazu kann formal nicht ausgeschlossen werden*, daß im spezifischen Milieu der Organkultur die DZ auf eine veränderte Art sich entwickeln, d.h. daß unter diesen Umständen das Prozessiervermögen mit steigender Kulturdauer wieder steigt. Weiterführende Experimente

mit einer erweiterten Palette von T Zell Hybridomen und immunzytochemischen Ansätzen werden diese offene Frage klären müssen.

Abbildung: 1

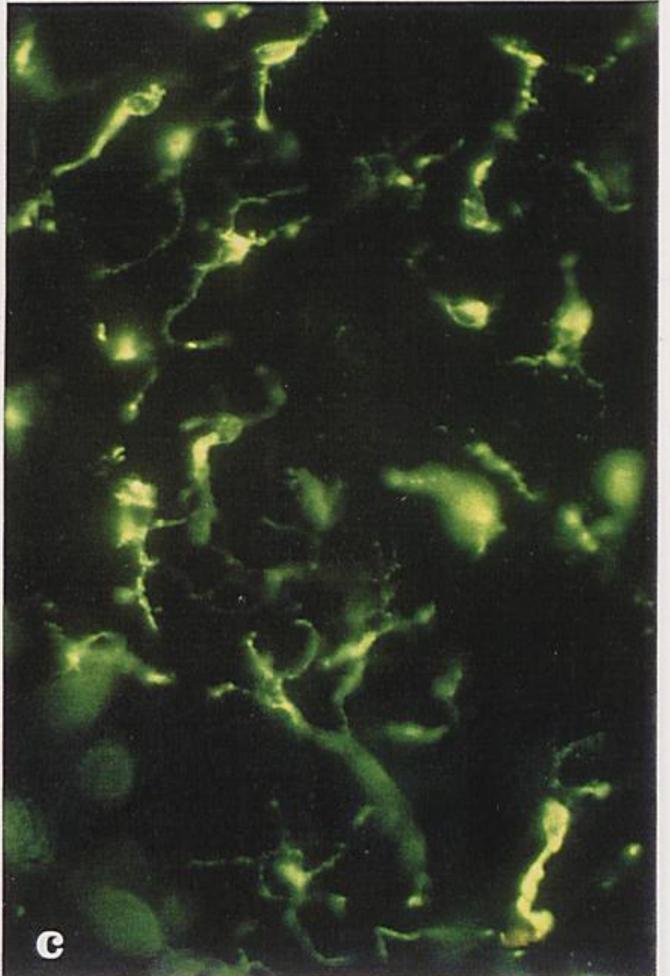
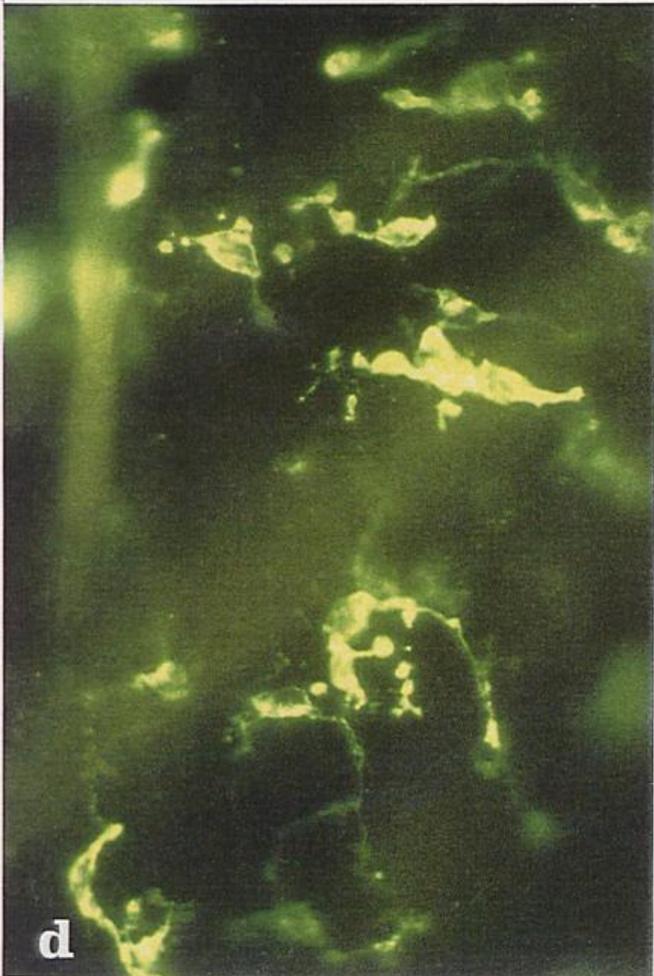
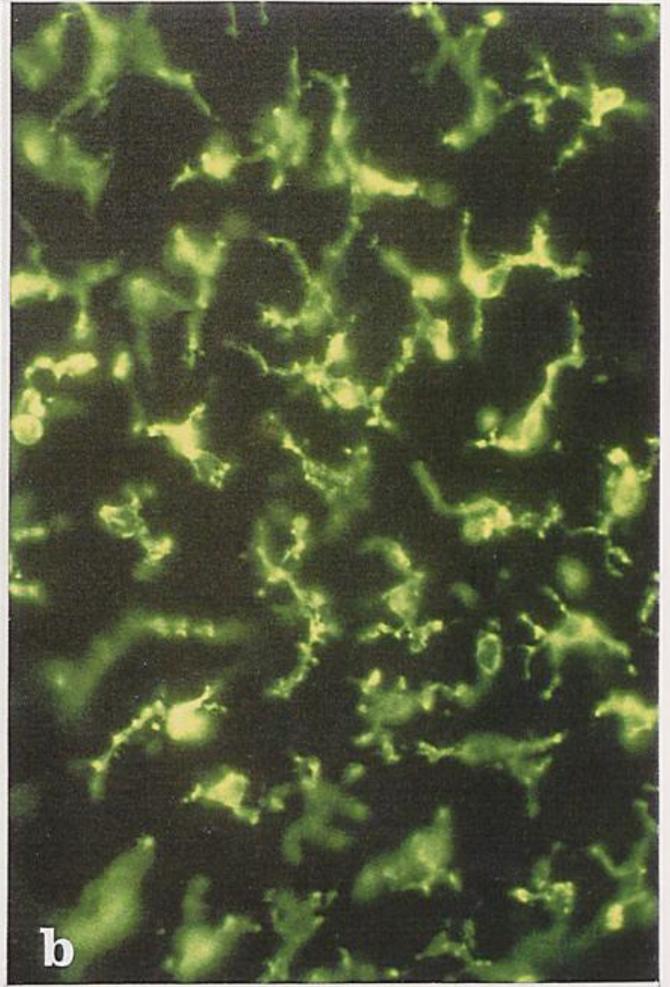
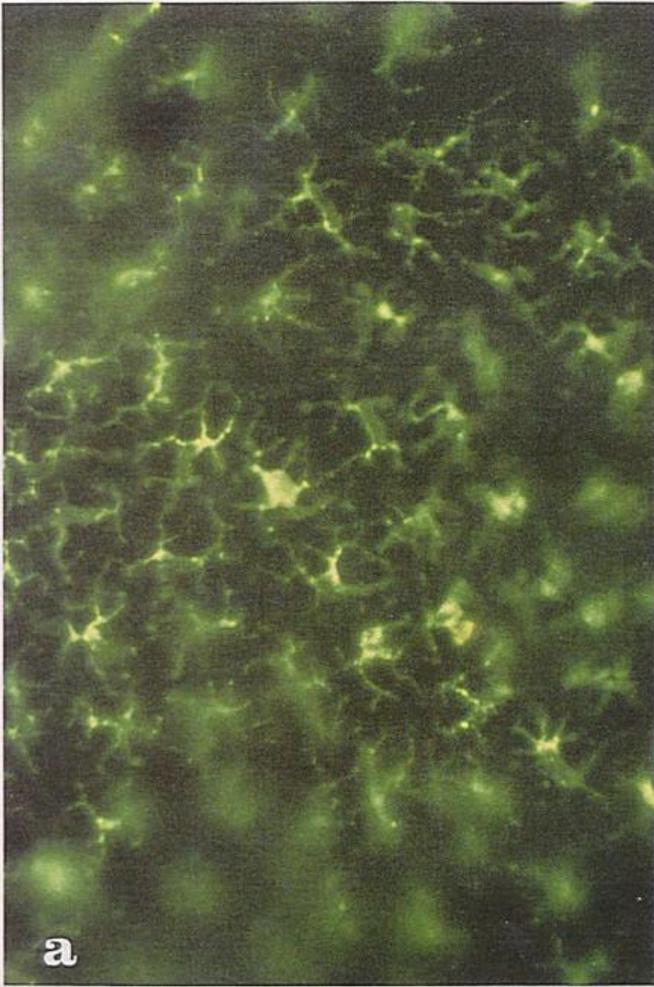


Abbildung: 2

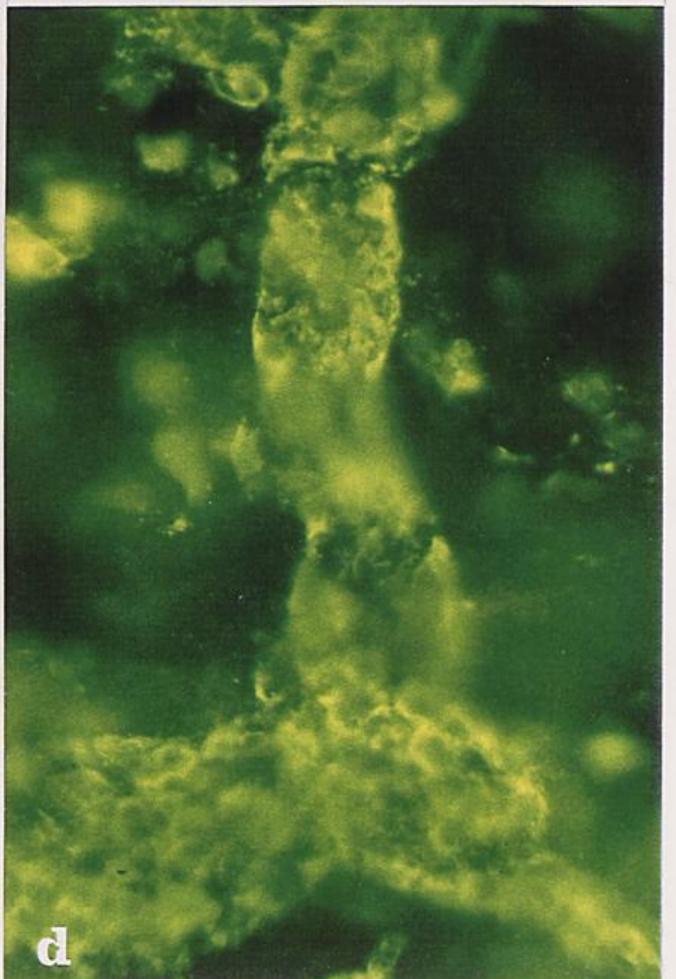
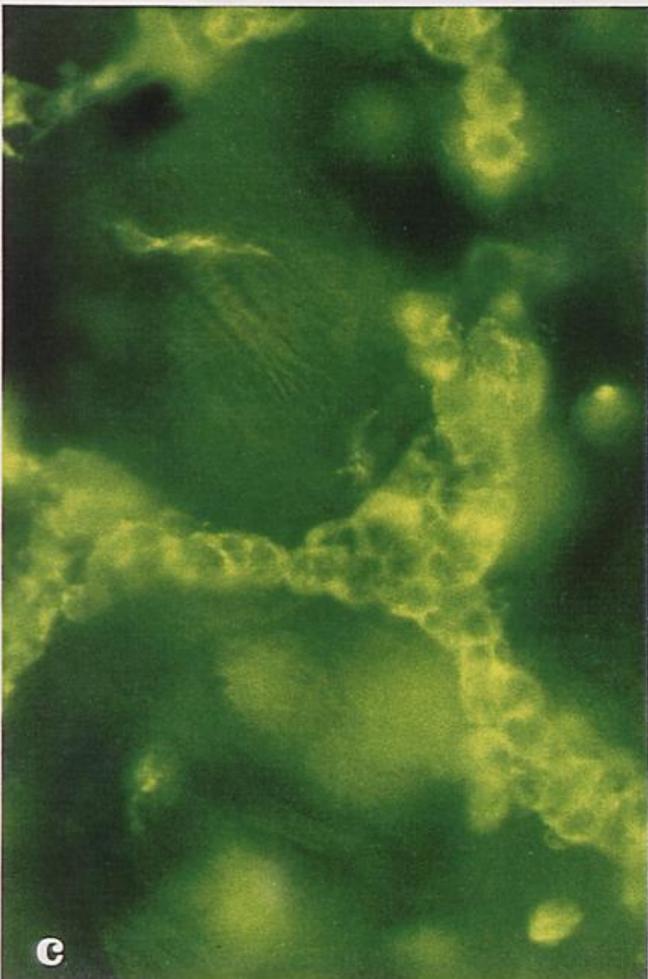
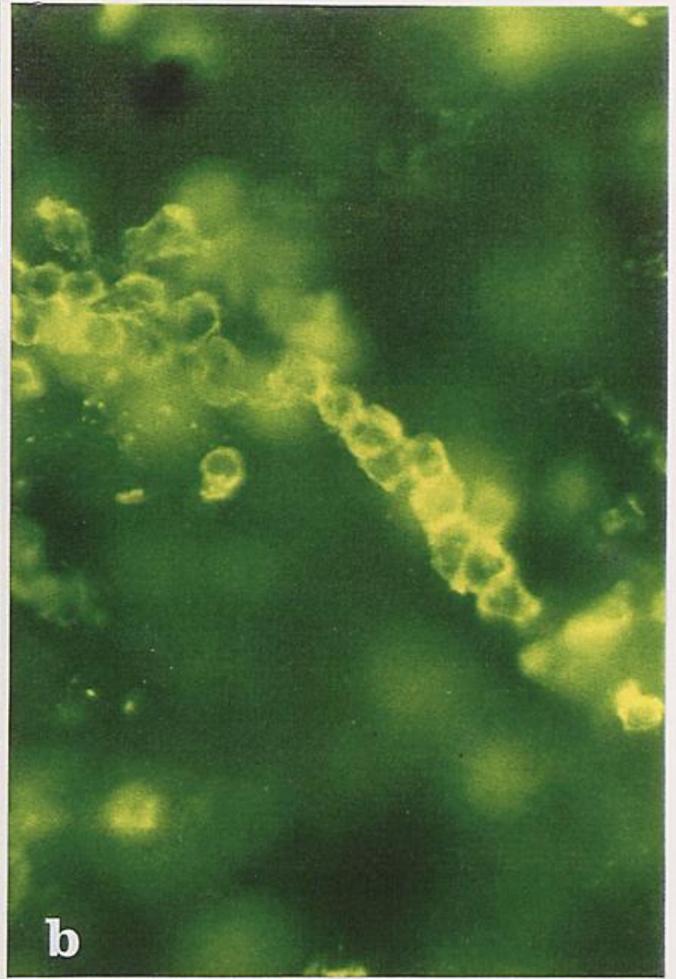
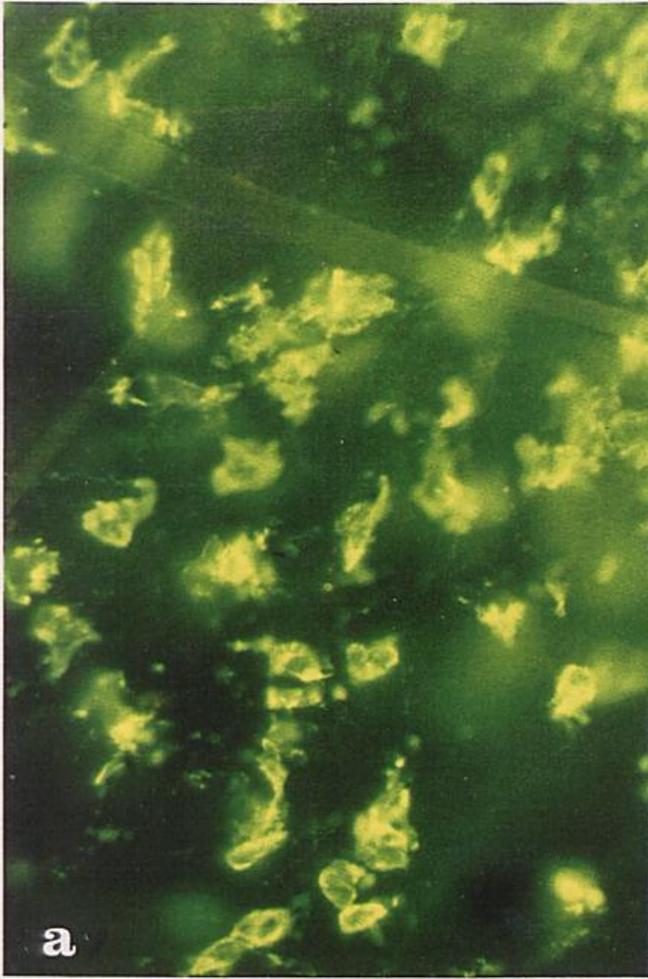


Abbildung: 3

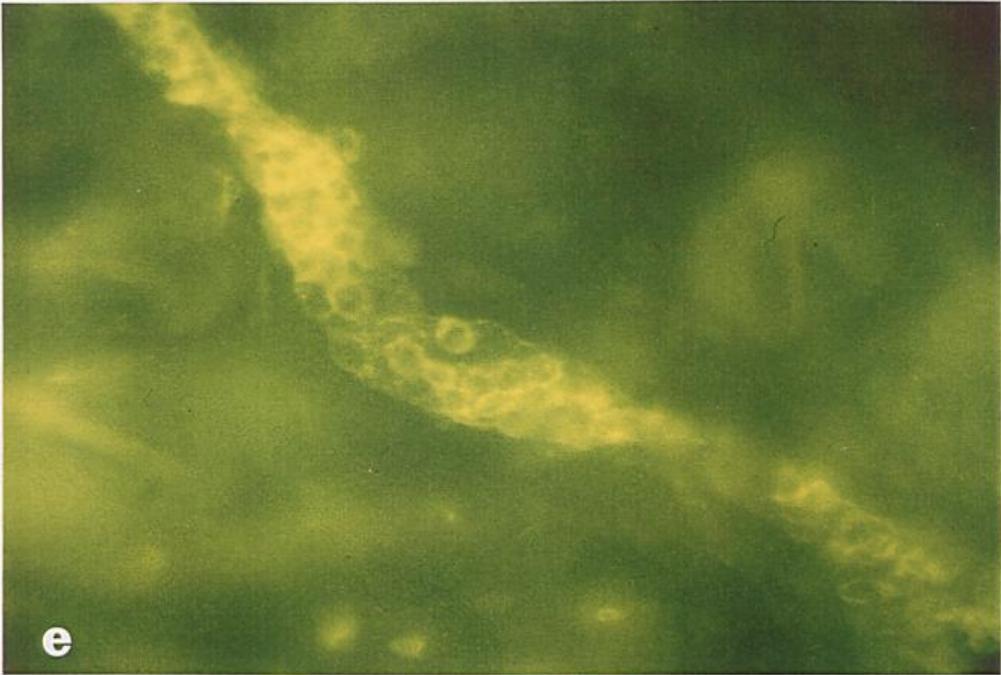
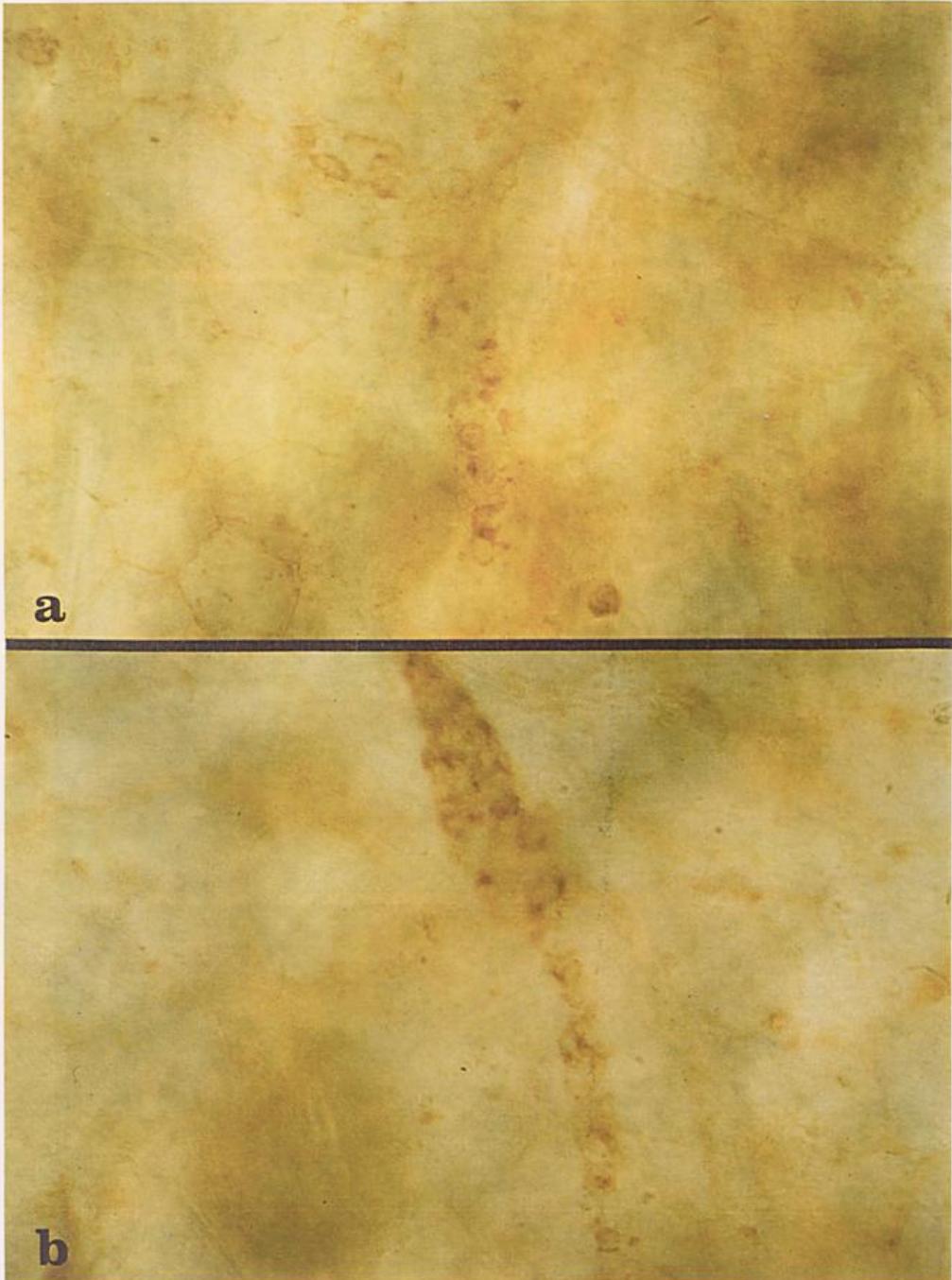
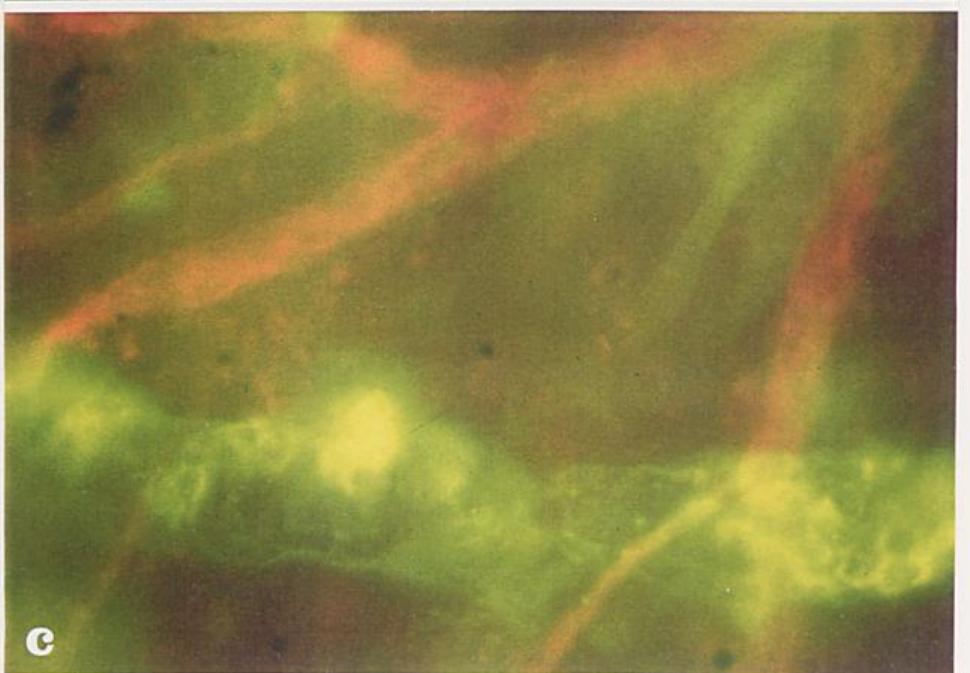
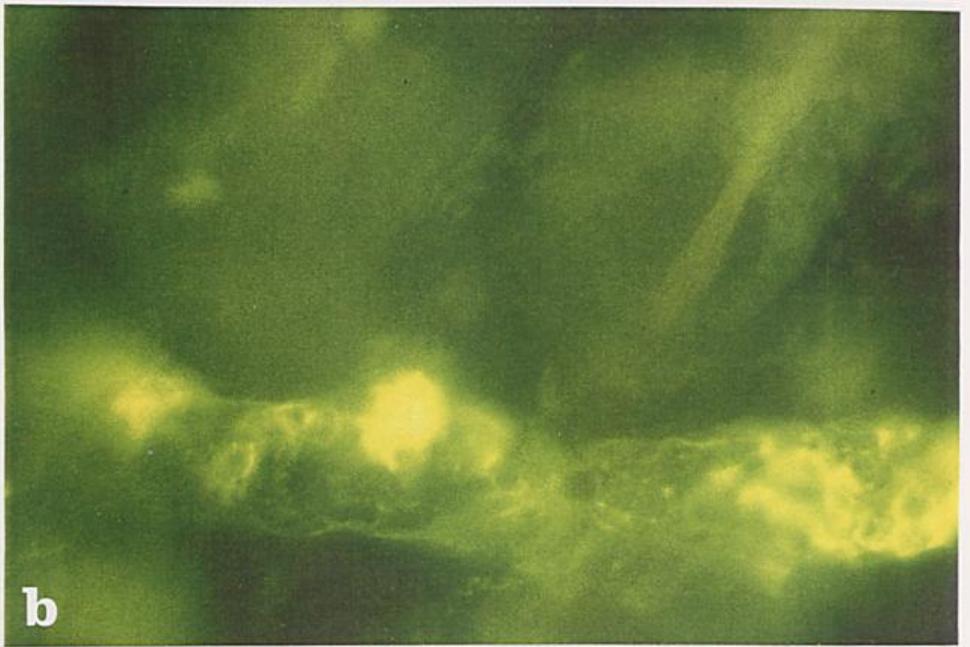
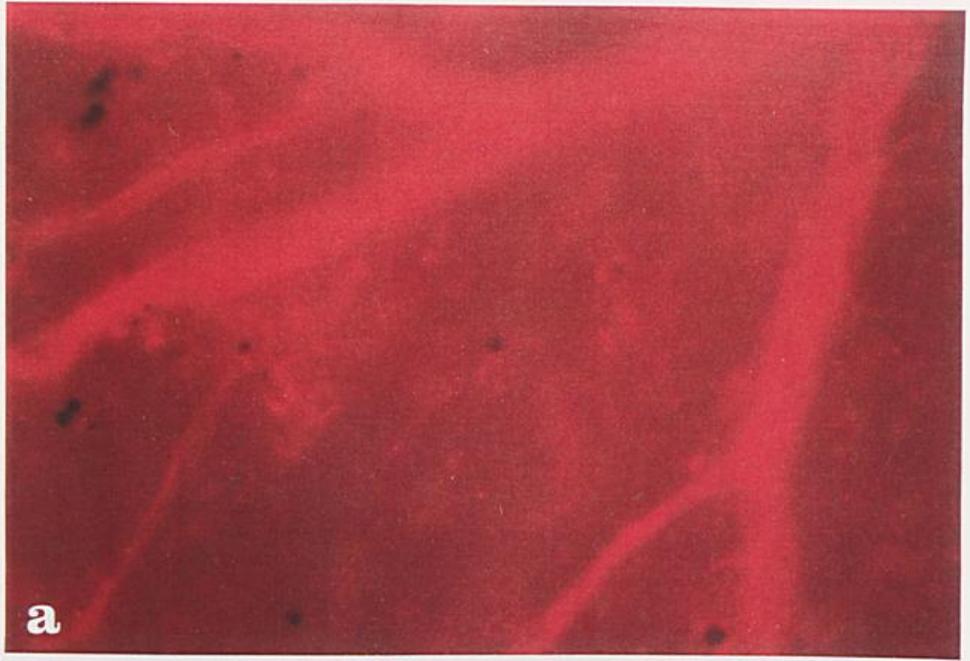


Abbildung: 4





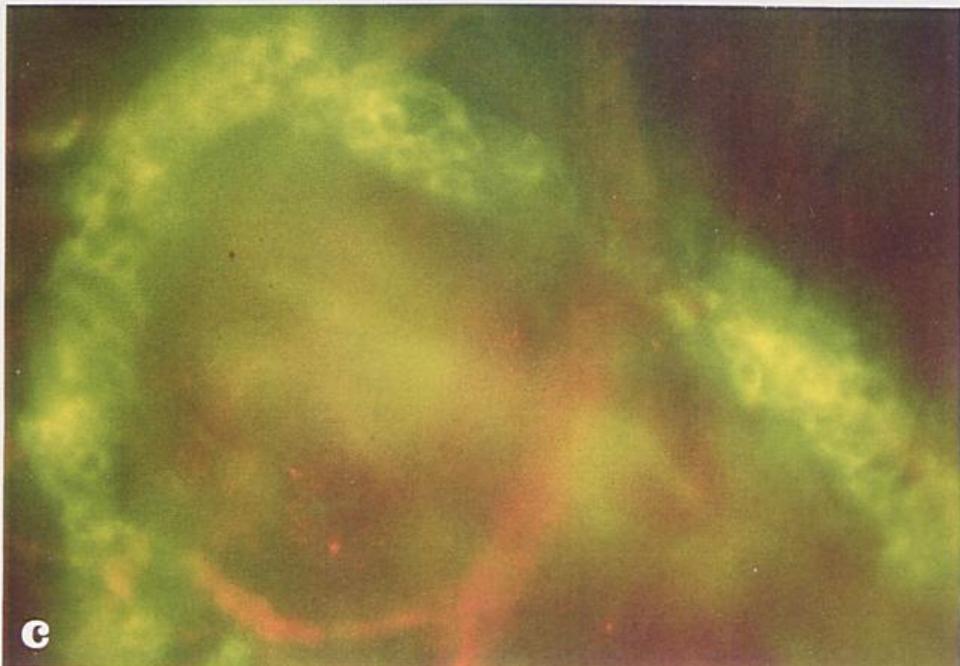
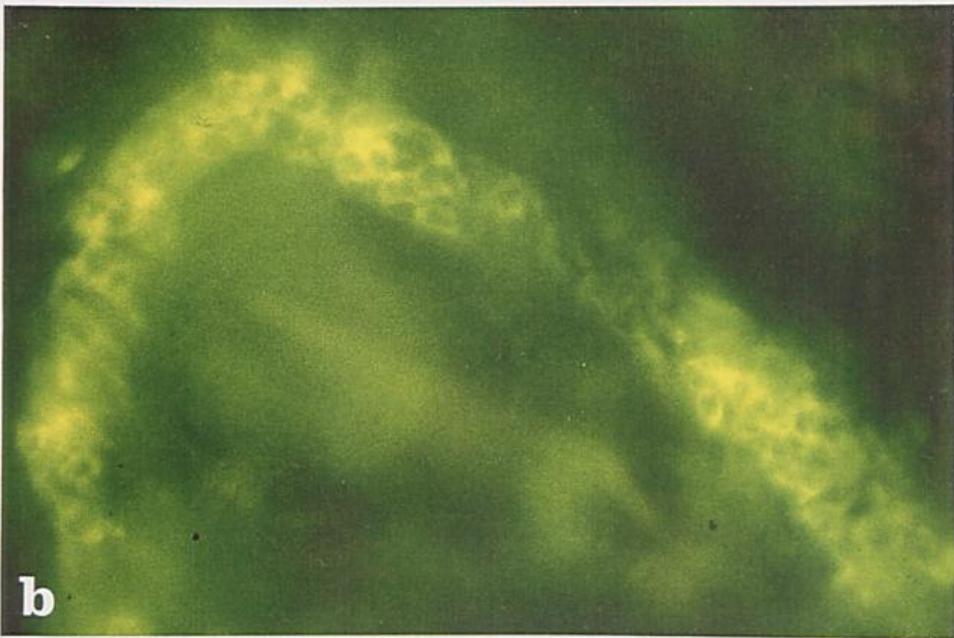
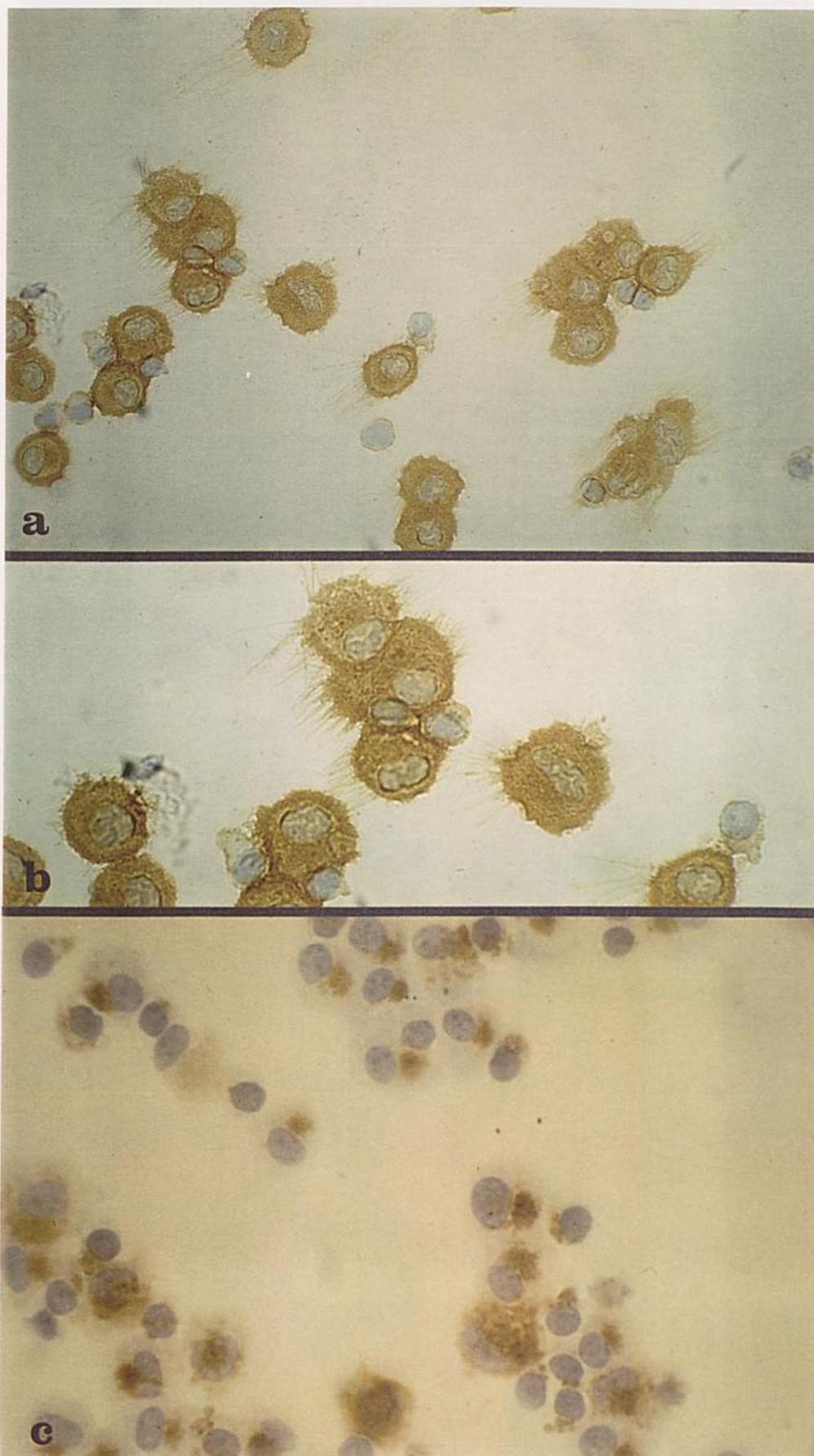
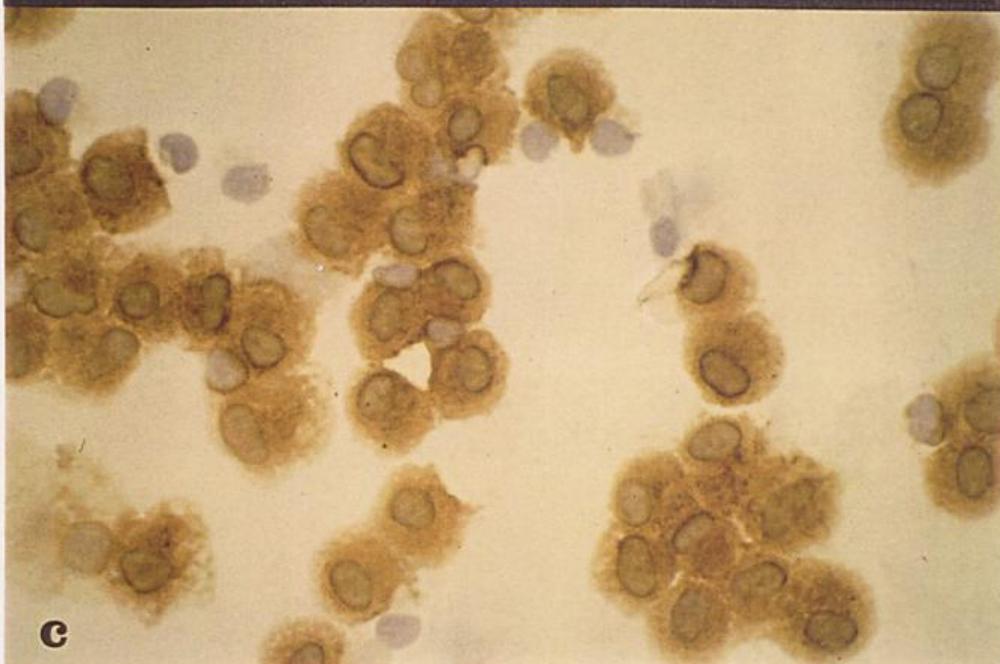
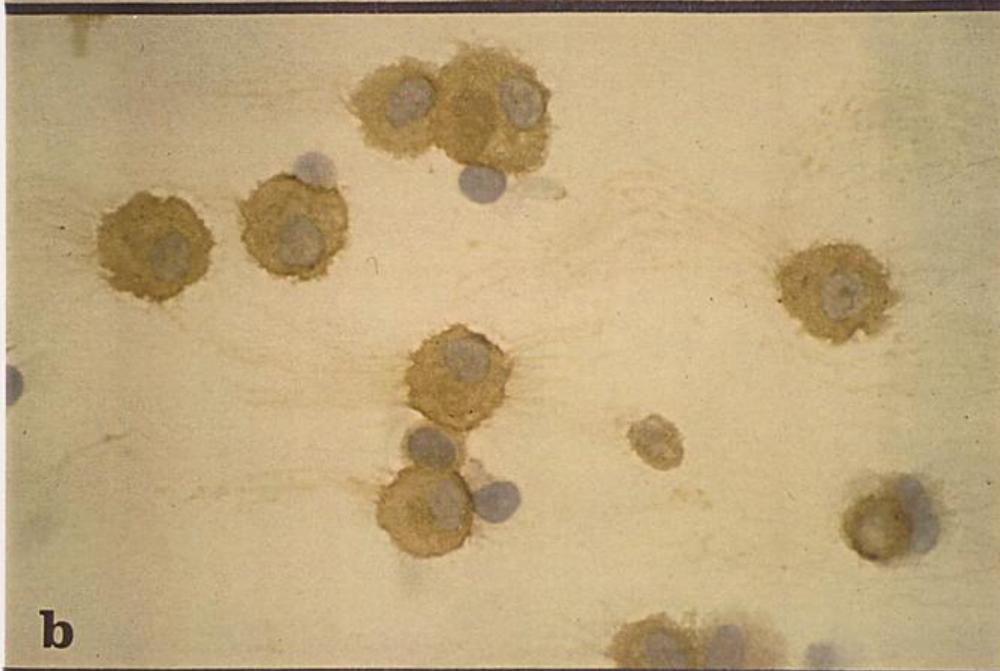
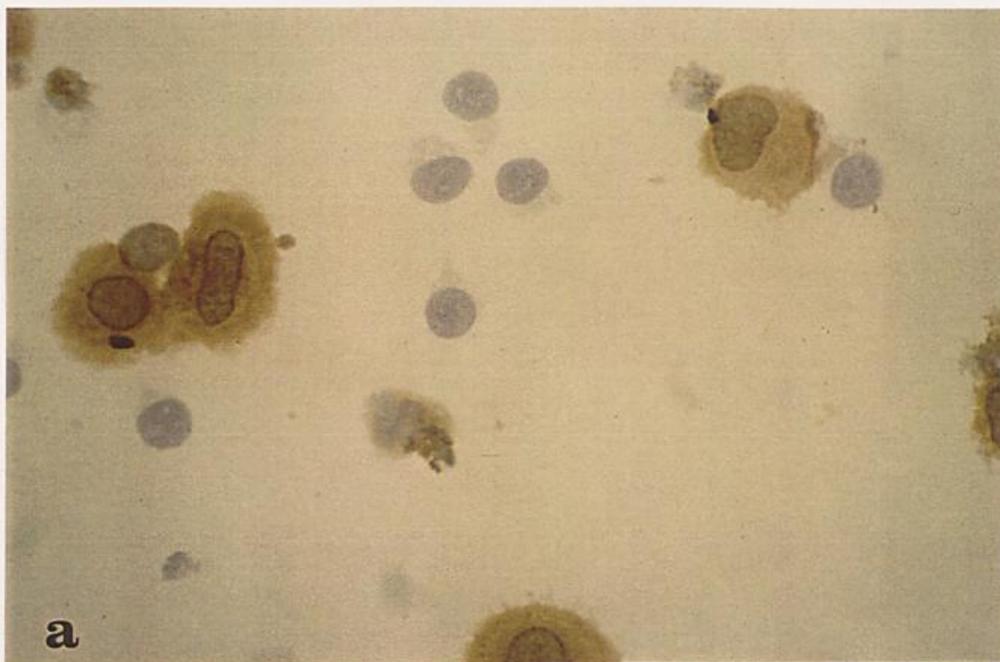
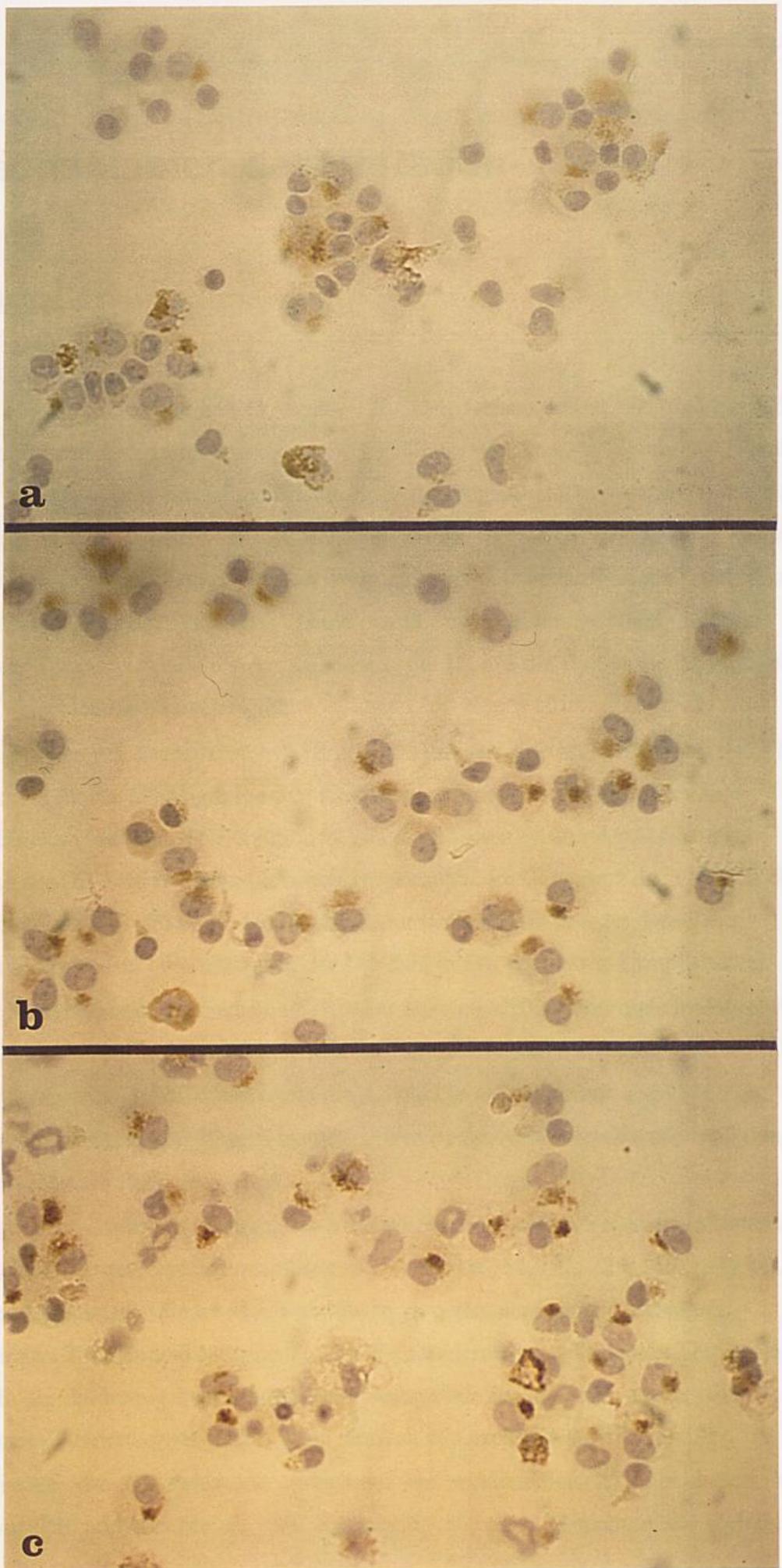


Abbildung: 7







## IV. Mechanismen der Migration

### 1.) Einleitung:

Zahlreiche Versuche und Studien [1, 7, 50, 123, 124] weisen darauf hin, daß die LZ nach Antigenkontakt und Antigenprozessierung die Epidermis verlassen, während ihrer Wanderung entlang der Lymphwege in die Lymphorgane einen Reifungsprozeß durchmachen, um dort auf spezifische, ruhende T-Zellen zu treffen und durch ihre Aktivierung eine spezifische Immunantwort auslösen. Diese Studien wurden vorwiegend am Modell der Kontakt-Hypersensitivität durchgeführt. Bis heute weiß man nicht, welche Zytokine bzw. Kombinationen von Zytokinen die Auswanderung der LZ aus der Epidermis triggern, obwohl es mehrere verschiedene Hinweise gibt:

- Rezente Studien von Cumberbatch & Kimber [92] zeigen die Möglichkeit auf, daß TNF-a der Stimulus für die LZ-Migration sein könnte. Eine intradermale Injektion von rekombinantem, murinen TNF-a führte zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Zunahme der DZ-Zahl in den regionären Lymphknoten. Im Gegensatz dazu führten GM-CSF, rec. humaner-TNF-a oder hitzeinaktivierter muriner TNF-a unter denselben Bedingungen nicht zu einer Zunahme der DZ-Zahl in den regionären Lymphknoten.
- Folgeexperimente von Cumberbatch & Kimber besagen, daß intradermale Injektion von 25 ng murinen rec. TNF-a schon nach 30 min eine signifikante Abnahme der LZ-Zahl in der Epidermis bewirkt. Unbeeinflusst bleibt die Zellzahl in der Epidermis aber durch die intradermale Injektion von 25 ng humanen TNF-a sowie durch intradermale Injektion von murinem GM-CSF [93].
- Seit langer Zeit war schon bekannt, daß Irritation, verursacht durch niedrig dosiertes UV-B die Entwicklung von Kontaktsensibilisierung verhindert [64, 122, 125, 126, 127], im Zuge von Experimenten, die diesen Mechanismus in vivo genauer analysieren sollten, beobachteten Streilein und Mitarbeiter, daß die intradermale Injektion von TNF-a die Zahl der LZ in der Epidermis absinken läßt und - wahrscheinlich als Folge davon - die Kontaktsensibilisierung verhindern kann, ähnlich wie nach UV-B-Irritation [91].
- Man machte die UV-induzierte Abnahme von epidermalen LZ für diesen Verlust verantwortlich und glaubte an eine Korrelation zwischen Abnahme der Zellzahl und

Abnahme der Sensibilisierung, wofür Daten aus verschiedenen Experimenten sprechen. Die Empfindlichkeit für UV-B wird genetisch im durch den Lps-Locus und TNF- $\alpha$ -Locus auf den Allelen kodiert [127]. Diese Gen-Loci regulieren die Mengen von TNF- $\alpha$ , welche als Antwort auf UV-B-Bestrahlung produziert wurden. So wurde die Rolle von TNF- $\alpha$  als wichtigstem Mediator des immunsuppressiven Effekts der UV-B-Bestrahlung, zumindest bei der Kontaktsensibilisierung, sehr wahrscheinlich. Doch wurde interessanterweise noch kein Beweis erbracht, daß Keratinozyten *in vivo* nach UV-B-Bestrahlung TNF- $\alpha$  synthetisieren und ausschütten. Nur *in vitro* konnte dies bisher nachgewiesen werden [144]. Diese Daten suggerieren, daß TNF- $\alpha$  der mögliche Stimulus für die LZ-Migration während der kutanen Immunantwort sein könnte. Andere Experimente weisen auf andere, alternative oder zusätzliche Stimuli hin:

- Die Gruppe Schreiber & Stingl [142] demonstrierte, daß Überstände hochangereicherter LZ IL-1, sehr wenig IL-6, GM-CSF und TNF- $\alpha$  aber keine IL-2, IL-3, IL-4 und IFN- $\gamma$ -Aktivität zeigen. Die Aktivitäten von IL-1, IL-6, GM-CSF und TNF- $\alpha$  konnten auch mit monoklonalen Antikörpern geblockt werden. Nachdem auch in hochangereicherten LZ noch Keratinozyten vorhanden sind, welche bekanntlich diverse Zytokine produzieren [128], wurden Vergleichsexperimente mit Keratinozyten gemacht. Daraus ergab sich, daß LZ die Hauptquelle für IL-6 darstellten, während IL-1 $\alpha$ , GM-CSF und TNF- $\alpha$  vorwiegend aus Keratinozyten stammten.
- Ergebnisse von Heufler & Topar weisen darauf hin, daß das Interleukin-1 $\beta$  in erster Linie von LZ produziert wird. Die mRNA für IL-1 $\beta$  wird während der Kultur von LZ (d3) stark aufreguliert. Weiters exprimieren LZ mRNA für die pro-inflammatorischen Zytokine MIP-1 $\alpha$  und MIP-2 (macrophage inflammatory protein) [129]. Diese Daten wurden zur gleichen Zeit von den Gruppen in Dallas [130] und Bethesda [95] bestätigt.
- Enk & Katz [95, 131] entdeckten, daß eine der frühesten Manifestationen von LZ-Aktivierung *in vivo* eine Zunahme von IL-1 $\beta$ -mRNA in LZ darstellt, welche schon 15 min. nach Kontaktallergenexposition auftritt. Das unterstreicht die Relevanz der *in vitro* Untersuchungen [129, 130], die eine gleichartige IL-1 $\beta$  Hochregulation während der Kultur fanden. Um den Effekt von IL-1 $\beta$  genauer zu untersuchen, spritzen sie dieses Zytokin intradermal in die Ohren von Balb/c-Mäusen und extrahierten vier Stunden später die gesamte epidermale RNA. Zum Vergleich wurden auch IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  gespritzt, bzw. Kontaktallergen (3% TNCB) appliziert. Mit Hilfe einer quantitativen, reversen-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktions-Technik wurden die Veränderungen in der

Expression der mRNA für verschiedene Zytokine und MHC Klasse II festgehalten und verglichen [131]. Hierbei zeigte sich, daß nach Injektion von 25ng IL-1 $\beta$  die Signale für mRNA von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, IL-10, TNF- $\alpha$  und MHC-Klasse-II um das 5-100 fache anstiegen, was dem mRNA-Zytokin-Profil nach Allergenexposition ähnelte. Injektionen von IL-1 $\alpha$  oder TNF- $\alpha$  veränderten das epidermale Zytokinprofil unwesentlich. TNF- $\alpha$  jedoch, sowie auch GM-CSF-mRNA erhöhte sich in epidermalen Zellen als Antwort auf Allergene wie auch auf Irritantien. Dagegen wurde die mRNA für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IP-10 (interferon-induced protein 10), MIP-2 und IL-10 spezifisch nur nach Exposition mit Kontaktallergen erhöht. Wie nach TNCB-Applikation [95] führte die IL-1 $\beta$  -Injektion (nicht aber die Injektion von IL-1 $\alpha$  oder TNF- $\alpha$ ) auch zu einer Zunahme der MHC-class-II Expression auf den LZ. Weiters waren die LZ aus mit IL-1 $\beta$  gespritzter Haut 2-3 mal stärker in den funktionellen Proliferationsassays (anti-CD3 Proliferationsassays) als die LZ der unterschiedlich behandelten Haut. Anhand gefärbter „sheets“ konnten die Autoren die Bedeutung von IL-1 $\beta$  für die Auswanderung demonstrieren: Die Dichte der LZ in IL-1 $\beta$  behandelte Epidermis war deutlich verringert.

- Ähnliche Evidenz für eine kritische Rolle von IL-1 $\beta$  bei der Migration stammt aus einer schwedischen Arbeit. Die Autoren fanden eine Abnahme der epidermalen LZ sowohl nach intradermaler, als auch nach intraperitonealer Injektion von IL-1 $\beta$  [132].

Bei der Interpretation und Diskussion der geschilderten Daten muß ein wichtiges „Caveat“ bedacht werden, auf welches eine Arbeit von Morhenn & Eugui [139] hinweist. Eine mRNA-Zunahme ist nicht gleichzusetzen mit einer Produktion und Sekretion von Zytokinen. Sie entdeckten, daß humane LZ nach Stimulation mit Phorbol myristate acetat zwar RNA für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  exprimieren und auch diese Zytokine produzieren, daß sie aber diese Proteine nicht in nachweisbaren Mengen sezernieren.

Die Vielfältigkeit der Hinweise und Untersuchungen demonstriert die Komplexität des Auswanderungsmechanismus. Ich versuche nun in meinem Organkultursystem diesen Mechanismus der Migration in vitro etwas genauer zu beleuchten.

## **2.)Fragestellung:**

Auf den in der Einleitung angeführten Daten aufbauend, stellte ich folgende konkrete Fragen:

1. Es gibt Hinweise darauf, daß Zytokine, im Besonderen TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$ , für die Migration der LZ verantwortlich sind. Ist es möglich, die Migration der LZ in meinem Organkultursystem mit Hilfe von Zytokinen auszulösen bzw. zu verstärken?
2. Besteht die Möglichkeit einer Blockade der Migration durch verschiedene Antikörper gegen Zytokine, spezifische Rezeptorantagonisten oder andere Reagenzien in meinem Organkultursystem?
3. Läßt sich die Organkultur mit der in vivo Verabreichung von Reagenzien kombinieren und ist dadurch eine genauere Abklärung des Migrationsmechanismus möglich?

### 3.) Versuche/Ergebnisse:

#### 3.1: Unterschiedliche Versuchsansätze mit Zugabe von Zytokinen:

In unterschiedlichen Versuchsansätzen erprobte ich die Wirkung der einzelnen Zytokine im Organkultursystem, wobei ich sowohl das „klassische“ als auch das „modifizierte“ System verwendete. Die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 (Interleukin-1 $\alpha$  +  $\beta$ ), IL-1 $\beta$ , GM-CSF und das Neuropeptid Sekretoneurin (siehe dort) wurden in unterschiedlichen Dosierungen dem Medium in meinem Organkultursystem zugesetzt und immer im Vergleich zur Auswanderung im reinen Kulturmedium, d.h. ohne beigesetzte Zytokine, betrachtet. Die Zugabe der einzelnen Zytokine und deren Dosierungen sind in den Tabellen genau angeführt.

#### a) Das klassische System: Kultur von Tag 0 auf Tag 3:

Zu den von Tag 0-Tag 3 inkubierten Ohrhälften wurden die Zytokine in unterschiedlicher Dosierung zugesetzt. Am 3. Tag wurden die Überstände abgesammelt, gepoolt, zentrifugiert und die Zellen ausgezählt (siehe TabVI.1). Mit diesen Ansätzen konnte jedoch keine Verstärkung der Migration erreicht werden; das System ist offensichtlich durch den Präpariervorgang voll aktiviert.

Tab.IV.1

<b>Balb/c</b>			
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	46.300	12.800
	TNF-a 1000 U/ml	32.000	9.600

<b>Balb/c</b>			
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	28.900	6.400
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	31.200	8.300
	TNF- $\alpha$ 32000 U/ml	20.700	5.400
	GM-CSF 2000 U/ml	28.400	7.600

<b>Balb/c</b>			
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 3	R10	26.200	11.700
	TNF- $\alpha$ 2500 U/ml	26.400	8.500

<b>Balb/c</b>			
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 4	R10	37.100	10.300
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	35.600	9.400
	GM-CSF 750 U/ml	38.200	11.100
	IL1 20 U/ml	43.300	11.700
	IL1 20 U/ml + GM-CSF 750 U/ml	47.400	12.400
	IL-1 $\beta$ 5 ng	37.600	14.600
	IL-1 $\beta$ 5 ng +GM-CSF 750 U/ml	42.600	16.600
	SN 10 <sup>-6</sup> molar	44.400	10.600

<b>Balb/c</b>			
		<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 5	R10	31.200	11.600
	IL-1 $\beta$ 20 U/ml	32.600	10.400

Legende: Ges.:Gesamtzahl der von Tag0-Tag3 ausgewanderten Zellen.  
 DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
 Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Trotz stärkerer Schwankungen der Zellzahlen kann man anhand dieser Experimente ablesen, daß die Zugabe von Zytokinen in das Medium keinen verstärkenden oder hemmenden Einfluß auf die Migration der LZ hat.

Um nicht einen primär verstärkenden Effekt, der sich bis zum d3 ausgleicht, zu übersehen, habe ich zur genaueren Beurteilung die gleichen Zytokine auch im modifizierten System ausgetestet (siehe Tab.IV.2).

**b) Das modifizierte System d0-d1-d2-d3:**

In diesem System transferiere ich die Ohrhäften täglich auf neues Medium und kann somit die täglich ausgewanderte Zellzahl erheben. Anhand der in Tab.VI.2 aufgelisteten Ergebnisse kann man erkennen, daß auch in diesem System keine Steigerung der Migration zu erreichen ist.

Tab.IV.2

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	32.200	7.400	23
		d1-d2	14.300	6.700	47
		d2-d3	7.100	5.000	70
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	33.900	9.400	28
		d1-d2	18.800	7.900	42
		d2-d3	11.200	8.500	76
	GM-CSF 500 U/ml	d0-d1	33.900	11.000	32
		d1-d2	17.600	8.800	50
		d2-d3	10.200	6.300	62

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d1	23.000	5.700	25
		d1-d2	24.600	11.400	46
		d2-d3	17.800	11.900	67
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	23.400	5.300	23
		d1-d2	21.100	9.000	43
		d2-d3	29.100	19.000	65
	GM-CSF 200 U/ml	d0-d1	26.800	5.800	22
		d1-d2	22.000	9.700	44
		d2-d3	18.900	11.800	62

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 3	R10	d0-d1	24.200	9.500	<b>39</b>
		d1-d2	18.700	10.400	<b>56</b>
		d2-d3	19.900	12.300	<b>62</b>
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	18.900	5.000	<b>26</b>
		d1-d2	21.700	13.200	<b>61</b>
		d2-d3	21.500	14.700	<b>68</b>
	GM-CSF 1000 U/ml	d0-d1	23.700	7.200	<b>30</b>
		d1-d2	27.000	16.300	<b>60</b>
		d2-d3	21.800	14.100	<b>65</b>

Legende: Ges.: Gesamtzahl der von Tag0-Tag1, von Tag1-Tag2, und von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen.

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Nachdem auch diese Versuche darauf hinwiesen, daß die Zugabe von Zytokinen keinen signifikanten Effekt auf die Migration der LZ bewirkten und lediglich der Anreicherungseffekt (siehe vorn) wieder deutlich wurde, strebte ich eine weitere Abklärung an. Einerseits gab es die Überlegung, ob eventuell das dem Medium R10 beigegebene FCS (fötales Kälberserum) schon ausreichend Zytokin enthielte und somit das zugefügte Zytokin nicht mehr zur Wirkung kommen könnte. Somit wäre ein sättigbares System denkbar, das durch einen Überschuß an Zytokin nicht weiter verstärkt werden kann bzw. die Migration nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip funktioniere. Dazu würde das Vorhandensein geringer Mengen Zytokin (ev. aus FCS oder auch von den Keratinozyten produziert) unter Umständen ausreichen, um die Migration der LZ in Gang zu setzen. Deshalb beobachtete ich das Verhalten der Migration in einem kommerziellen serumfreien Medium und in reinem RPMI 1640 ohne FCS im Gegensatz zu R10 (Tab. VI.3.) und verfolgte daraus die Idee, daß nun durch Zugabe von Zytokinen die Migration der LZ gesteigert werden könnte (siehe Tab.IV.4).

Tab.VI.3:

Austestung der serumfreien Medien im modifizierten System:

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	20.600	8.800	43
		d1-d2	22.800	11.000	48
		d2-d3	15.400	10.100	66
	RPMI (serumfrei)	d0-d1	18.800	4.500	24
		d1-d2	7.300	2.700	37
		d2-d3	5.100	3.000	59
	AIM V (serumfrei)	d0-d1	19.000	3.300	17
		d1-d2	10.200	4.700	46
		d2-d3	10.000	4.900	49

Die deutlich niedrigeren Zellzahlen dieses Probeexperimentes veranlaßten nun den Versuch, die Migration der DZ mit Hilfe von Zytokinen hier im serumfreien Medium anzutreiben (siehe Tab.IV.4):

Tab.IV.4:

Wirkung der Zytokine auf die DZ-Auswanderung im serumfreien Medium:

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	AIM V	d0-d1	11.100	4.200	38
		d1-d2	14.900	7.800	52
		d2-d3	8.300	4.600	55
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	9.300	4.100	44
		d1-d2	13.900	6.900	50
		d2-d3	23.000	12.500	54
	GM-CSF 750 U/ml	d0-d1	11.800	5.700	48
		d1-d2	17.600	9.600	55
		d2-d3	14.100	7.900	56

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	AIM V	d0-d1	7.700	2.700	<b>35</b>
		d1-d2	9.900	5.100	<b>52</b>
		d2-d3	15.000	11.100	<b>74</b>
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	10.600	3.500	<b>33</b>
		d1-d2	10.500	5.300	<b>50</b>
		d2-d3	20.200	14.500	<b>72</b>
	GM-CSF 750 U/ml	d0-d1	9.600	3.700	<b>39</b>
		d1-d2	10.900	6.300	<b>58</b>
		d2-d3	16.600	9.600	<b>58</b>
	IL-1 $\beta$ 20 U/ml	d0-d1	9.200	3.800	<b>41</b>
		d1-d2	9.800	4.900	<b>50</b>
		d2-d3	17.800	12.600	<b>71</b>

Legende: Ges.: Gesamtzahl der von Tag0-Tag1, von Tag1-Tag2, und von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen.

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Diese beiden Versuche demonstrieren, daß zwar die Zellzahlen allgemein deutlich niedriger sind als bei der Kultur, die mit dem serumhaltigen Medium angesetzt wurde (dieser Unterschied ist vor allem am Tag 1 besonders ausgeprägt), doch ist es wiederum nicht möglich mit Zytokinen eine verstärkte Auswanderung zu erzielen. Die Ursache für die erheblich niedrigeren Zellzahlen bei der Migration ist wohl im Fehlen des fötalen Kälberserums zu suchen, im Speziellen aber nicht völlig klar.

Als weiterer Punkt, der ursächlich sein könnte für die relativ gleichmäßige Auswanderung mit und ohne Zytokine, ist das im fötalen Kälberserum enthaltene Lipopolysaccharid (LPS), welches bekanntermaßen zu einer Aktivierung von TNF- $\alpha$  führt. Zwar müßte diese Möglichkeit mit dem serumfreien Vollmedium AIM V theoretisch ausgeschlossen sein, da man aber das genaue Verhalten der DZ im serumfreien Medium nicht kennt, versuchte ich diese Möglichkeit durch Verwendung von LPS-resistenten Mäusen (C3H/HEJ/Cr/IBR) zu umgehen. Um Vergleichszahlen erheben zu können, wurde es notwendig, auch normale C3H-Mäuse in meinem Organkultursystem auszutesten (siehe Tab.IV.5).

Tab.IV.5:

Austestung des Systems mit einem anderen Mausstamm (C3H-Mäuse)

<b>C3H-Mäuse im klassischen System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d3	17.900	6.300
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d3	11.300	5.900
	GM-CSF 1000 U/ml	d3	21.400	7.400

<b>C3H-Mäuse im modifizierten System</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d1	13.200	5.200	<b>39</b>
		d1-d2	14.900	9.700	<b>65</b>
		d2-d3	9.200	6.200	<b>67</b>
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	11.200	4.200	<b>38</b>
		d1-d2	13.700	7.500	<b>55</b>
		d2-d3	14.500	10.300	<b>71</b>
	GM-CSF 750 U/ml	d0-d1	19.800	6.100	<b>31</b>
		d1-d2	12.200	7.100	<b>58</b>
		d2-d3	9.800	6.900	<b>70</b>

Legende: Ges. Exp.1: Gesamtzellzahl der von Tag0-Tag3 ausgewanderten Zellen

Ges. Exp.2: Gesamtzahl der von Tag0-Tag1, von Tag1-Tag2, und von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen.

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Wie auch schon im vorangegangenen Kapitel III kann mit diesen Zahlen demonstriert werden, daß die Verhältnisse prinzipiell gleich sind wie bei den Versuchen mit Balb/c-Mäusen, wobei lediglich die Zellzahlen etwas geringer sind. Diese Tatsache ergibt sich einfach aus den bekanntermaßen niedrigeren DZ-Zahlen der C3H-Mäuse.

Somit konnten nun die LPS-resistenten Mäuse versus den C3H-Mäusen verwendet werden, um zu beobachten, ob der, durch das LPS ausgelöste TNF- $\alpha$  an sich schon eine stimulatorische Wirkung auf die Migration der LZ hat (siehe Tab.IV.6).

Tab.IV.6:

LPS-resistente Mäuse versus normale C3H-Mäuse:

<b>LPS-resistente C3H-Mäuse</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	8.600	3.200	37
		d1-d2	9.600	5.700	59
		d2-d3	13.600	8.700	64
	TNF- $\alpha$ 500 U/ml	d0-d1	9.600	3.800	40
		d1-d2	9.100	5.300	58
		d2-d3	16.700	11.200	67
	GM-CSF 500 U/ml	d0-d1	13.800	6.200	45
		d1-d2	14.800	8.700	59
		d2-d3	13.400	8.800	66

<b>C3H-Mäuse</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	8.600	4.400	51
		d1-d2	10.100	5.700	56
		d2-d3	9.400	5.700	61
	TNF- $\alpha$ 500 U/ml	d0-d1	8.200	4.200	51
		d1-d2	12.600	8.000	63
		d2-d3	11.100	9.100	82
	GM-CSF 500 U/ml	d0-d1	11.800	4.800	41
		d1-d2	13.600	9.000	66
		d2-d3	10.800	7.700	71

Legende: Ges.: Gesamtzahl der von Tag0-Tag1, von Tag1-Tag2, und von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen.  
 DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
 %DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl  
 Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Aufgrund der allgemein hohen Schwankungen der Zellzahl kann man auch bei diesen Zahlen nicht von signifikanten Wirkungen der Zytokine auf die DZ-Migration sprechen. Auch sind keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS-resistenten und normalen C3H-Mäusen zu registrieren, woraus sich schließen läßt, daß das Lipopolysaccharid bzw. dessen Wirkung auf TNF- $\alpha$  keinen Einfluß auf die Migration der LZ in diesem System hat. Die bisherigen Ergebnisse erbrachten also keinen Hinweis darauf, daß Zytokine in diesem Organkultursystem eine Steigerung oder eine Verminderung der LZ-Auswanderung bewirken. Eine kleine Veränderung des System in Form einer Triggerrung brachte jedoch einen neuen Gesichtspunkt ein.

### c) Das „getriggerte“ Sytem:

Abgeschnittene Ohren wurden in einer Petrischale mit PBS- angefeuchteten Tupfern im Kühlschrank (4°C) einige Stunden (20-30 h) aufbewahrt und erst dann in einer Organkultur aufgelegt. Auch diesem Organkultursystem gab ich verschiedene Zytokine bei.

Unter der Annahme, daß in einem fast abgestorbenen System die endogene Zytokinproduktion schon abgeflacht bzw. eingestellt wurde, wird eventuell zu diesem Zeitpunkt eine durch Zytokine induzierte, „getriggerte“ Migration der DZ möglich. Die hierzu gemachten Experimente sind in Tab.IV.7 aufgelistet.

Tab.IV.7:

28 Stunden Triggerzeit <sup>1</sup>				
			Ges.	DZ
Exp. 1	R10	d0-d2	26.600	6.200
	R10	d0-d2	27.400	6.300
	TNF- $\alpha$ 1500 U/ml	d0-d2	35.200	13.200

<b>25 Stunden Triggerzeit<sup>1</sup></b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d2	36.100	6.200
	TNF $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d2	35.600	9.100
	GM-CSF 1000 U/ml	d0-d2	32.200	8.900
	SN $10^{-6}$ U/ml	d0-d2	44.400	10.600
	IL-1 20 U/ml	d0-d2	43.300	11.700
	IL-1 + GM-CSF	d0-d2	47.400	12.400
	IL-1 $\beta$ 20 U/ml	d0-d2	31.600	8.700
	IL-1 $\beta$ + GM-CSF	d0-d2	36.600	9.600

<b>30 Stunden Triggerzeit<sup>1</sup></b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 3	R10	d0-d2	24.000	5.200
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d2	48.900	13.000
	GM-CSF 750 U/ml	d0-d2	41.000	12.100
	SN $10^{-6}$ molar	d0-d2	36.100	10.000

Legende: 1:Angabe der Abliegezeit im Kühlschrank in Stunden  
 Ges.:Gesamtzahl der von Tag0-Tag2 ausgewanderten Zellen  
 DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
 Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.  
 SN: Neuropeptid Sekretoneurin (siehe Kap.VI)

Diese 3 Versuche zeigen sehr deutlich, daß im reinen Medium R 10 nur noch eine geringe DZ-Auswanderung stattfindet, während durch die Zugabe von Zytokinen die Auswanderung wieder in Gang gesetzt werden kann. Vor allem durch den dritten Versuch, in dem die „Triggerzeit“ auf 30 Stunden erhöht wurde und die Inkubation auf verkürzt wurde (40 Stunden) konnte der stimulatorische Effekt der Zytokine sehr deutlich herausgearbeitet werden, wobei offensichtlich sämtliche Zytokine fähig sind, die Migration zu induzieren.

Unter der Annahme, daß die Kühlung bei 4°C einerseits und die lange Abliegezeit andererseits zu einer Immobilisierung bzw. Absterben der eigenen (durch Keratinozyten) Zytokinproduktion führt, kann nun somit durch die Zugabe der verschiedenen Zytokine die

unterbrochene Aktivierungskaskade wieder in Gang gesetzt werden. Nachdem dies mit sämtlichen Zytokinen möglich ist, könnte es sich um eine längere Aktivierungskaskade der Zytokine handeln, in die durch die verschiedenen Zytokine in unterschiedlichen Stufen eingegriffen wird, das Resultat aber, also die Migration, gleich bleibt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Zellen aus der Epidermis auch schon ohne exogen zugegebenes Zytokin auswandern, d.h. schon während der Abliegezeit im Kühlschrank. Die während der Kultur zugegebenen Zytokine würden das Überleben der Zellen und ihre weitere Wanderung ins Medium sichern. Dagegen spricht, daß vom IL-1 nicht gezeigt werden konnte, daß es die Viabilität von DZ erhält/steigert [43, 44]. Außerdem zeigten immunhistochemische Färbungen am Ende der Abliegezeit im Kühlschrank, daß die Dichte der LZ am epidermalen „sheet“ unverändert war und daß in der Dermis keine CORDS zu finden waren.

### **3.2 Verschiedene Versuchsansätze mit Antizytokinen**

Nachdem die Zugabe von Zytokinen im klassischen und im modifizierten Organkultursystem keine Klarheit über den Migrationsstimulus erbrachte, schloß ich daraus, daß durch das Abschneiden der Mäuseohren ein so massiver Effekt gesetzt wurde, daß die Auswanderung dadurch schon voll in Gang gesetzt wurde. Folglich bestünde lediglich die Möglichkeit durch Hemmung des Systems mit Anti-Zytokin-Reagenzien, das verantwortliche Zytokin genauer zu definieren.

#### **a) Zugabe von Anti-TNF- $\alpha$ :**

Neben dem mAk Anti-TNF- $\alpha$  „V1q“, der uns freundlicherweise von Dr. PH Kramer, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg und Dr. B.Echtenachter, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt wurde, erhielten wir auch noch einen mAk Anti-TNF- $\alpha$  „1F3F3“, ein Aszitespräparat, der von Dr. R.Lucas, Freie Universität Brüssel, kam. Ein weiterer polyklonaler Anti-TNF- $\alpha$  wurde uns von Dr.P. Vasalli, Universität Genf, zur Verfügung gestellt. Auch kommerzielle polyklonale Anti - murin - TNF- $\alpha$  Antikörper (Innogenetics, Bender, Wien; Genzyme, Cambridge, MA; Lemania, Genf, CH) wurden verwendet.

Diese Antizytokine wurden meinem Organkultursystem zugefügt mit der Annahme, daß ein voll aktiviertes Migrationssystem nur noch durch Blockierung beeinflusst und somit genauer

definiert werden kann. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tab.IV.8 aufgelistet, wobei die verwendeten Dosierungen wieder direkt der Tabelle zu entnehmen sind.

Tab.IV.8:

Anti-TNF- $\alpha$  1F3F3:

<b>Balb/c</b>			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	24.200	9.500	<b>39</b>
		d1-d2	18.700	10.400	<b>56</b>
		d2-d3	19.900	12.300	<b>62</b>
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	19.000	6.700	<b>35</b>
		d1-d2	21.700	13.200	<b>61</b>
		d2-d3	21.500	14.600	<b>68</b>
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml + 1F3F3 3000 U/ml	d0-d1	19.100	6.400	<b>34</b>
		d1-d2	26.800	14.400	<b>54</b>
		d2-d3	24.900	16.800	<b>67</b>
	1F3F3 3000 U/ml	d0-d1	22.000	7.000	<b>32</b>
		d1-d2	23.700	13.400	<b>57</b>
		d2-d3	17.700	11.300	<b>64</b>

<b>Klassisches System</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	
Exp. 2	R10	d0-d3	27.300	11.400	
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d3	39.400	15.100	
	1F3F3 3000 U/ml	d0-d3	28.800	10.900	

<b>Klassisches System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 3	R10	d0-d3	28.900	10.700
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d3	31.200	12.100
	1F3F3 9000 U/ml	d0-d3	40.100	13.200

Legende: Ges. Exp. 1: Gesamtzahl der von Tag0-Tag1, von Tag1-Tag2, und von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen.

Ges. Exp. 2 u. 3 : Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

U bei den Antikörpern bedeutet die vom Hersteller angegebenen „neutralisierenden Units“

Nachdem auch eine Erhöhung der Dosis von 1F3F3 zu keiner Blockierung des Systems führte, wurde dieser Anti-TNF- $\alpha$  als ungeeignet betrachtet, wobei nicht klar war, ob er nicht funktionierte, oder ob das System in dieser Form nicht funktionierte.

#### Anti-TNF- $\alpha$ V1q:

Im Anschluß daran wurde ein weiterer Anti-TNF- $\alpha$  in meinem Organkultursystem angewandt, vor allem aufgrund der Aussage von Cumberbatch & Kimber [93], welche den TNF- $\alpha$  als verantwortliches Zytokin für die Migration beschreiben. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Tab. IV.9 aufgelistet, wobei auch hier wieder die verwendeten Dosierungen der Anti-Zytokine in der Tabelle genau definiert sind.

Tab.IV.9:

<b>Klassisches System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d3	28.900	10.600
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d3	31.200	12.100
	V1q 3200 U/ml	d3	34.700	12.300
	V1q 3200 U/ml + TNF- $\alpha$ 10000 U/ml	d3	35.800	9.300
	V1q 32000 U/ml	d3	10.100	1.600

<b>Klassisches System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	d3	28.900	10.400
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d3	31.200	12.100
	V1q 16000 U/ml	d3	40.700	1.700
	V1q 8000 U/ml	d3	30.800	1.700
	V1q 16000 U/ml + TNF- $\alpha$ 32000 U/ml	d3	47.800	2.000

Legende: Ges.:Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Zwar sind hier die Zellzahlen bei Zusatz von Anti-TNF- $\alpha$  V1q deutlich verringert, doch erschienen die noch vorhandenen DZ schwer geschädigt. Bei diesem Anti-TNF- $\alpha$  V1q handelt es sich um einen, von Hybridomen produzierten Überstand, der 10% Pferdeserum enthielt.

Diese Tatsache einerseits und auch das Faktum andererseits, daß ein Überschuß von TNF- $\alpha$  nicht in der Lage war, die „Hemmung“ wieder aufzuheben, veranlaßte uns dazu, diesen Anti-TNF- $\alpha$  V1q auf Toxizität zu prüfen (siehe Toxizitätstest für V1q und Anti-TNF- $\alpha$  von Vasalli). Der Antikörper war toxisch.

Weitere vorhandene Anti-TNF- $\alpha$  wurden in meinem Organkultursystem ausgetestet (siehe Tab.IV.10).

Tab.IV.10:Austestung weiterer Anti-TNF- $\alpha$ :

<b>Klassisches System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d3	40.900	12.100
	Anti -TNF- $\alpha$ 1000 U/ml Genzyme 20ng/ml	d3	34.000	8.200
	Anti -TNF- $\alpha$ Vasalli 70 $\mu$ l	d3	20.400	700
	Anti -TNF- $\alpha$ Lemania 1700 U/ml	d3	42.200	11.800

Legende:Ges.:Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

In diesem Versuch zeigte lediglich der Anti-TNF- $\alpha$  von Vasalli eine Wirksamkeit, wobei auch hier bei der Auszählung der, nach dem 3. Tag abgesammelten, Zellen wieder eine starke Schädigung dieser zum Vorschein kam, und andererseits die extrem niederen Zellzahlen unglaublich erschienen. Daraus erfolgte die Dringlichkeit eines Zytotoxizitätstests, indem die Toxizität der verwendeten Reagenzien überprüft werden konnte. Dieser Antikörper stellte sich als toxisch heraus.

Toxizitätstest für Anti-TNF- $\alpha$  V1q und Vasalli:

In einer 96-well-Rundboden-Gewebekulturplatte wurden frisch ausgewanderte DZ (d0-d1-DZ) ausplattiert (11.000 DZ/well bei einer Anreicherung von 38 %) in einem Volumen von 200  $\mu$ l/well. Bei dieser Anreicherung ist anzunehmen, daß genügend Keratinozyten und andere Zelltypen vorhanden sind, die ausreichend Zytokine zum Überleben der DZ produzieren würden. Anschließend wurden:

Je 2 well versehen mit: reinem Medium R 10

je 2 well mit 500 U/ml GM-CSF

je 2 well mit 16.000 U/ml V1q

je 2 well mit 16.000 U/ml V1q + GM-CSF

je 2 well mit 40  $\mu$ l/ml Anti-TNF- $\alpha$  Vasalli

je 2 well mit 40 $\mu$ l/ml Anti-TNF- $\alpha$  Vasalli + GM-CSF

je 2 well mit dem Überstand aus der Organkultur

Die Auszählung im Hämocytozometer der mit Trypanblau zur Bestimmung der Viabilität gefärbten Zellen und deren Auswertung nach einem Tag ergab folgendes Ergebnis: Während die DZ in R 10, in GM-CSF pur und mit dem Überstand aus der Organkultur weitgehend überlebten, sind die Zellen bei Zusatz von Anti-TNF- $\alpha$  V1q oder Vasalli fast zur Gänze abgestorben. Auch der Zusatz von GM-CSF zu den Anti-TNF- $\alpha$  V1q oder Vasalli konnte das Absterben der DZ nicht verhindern, und das obwohl GM-CSF erwiesenermaßen das wichtigste Zytokin für die Vitalität und Reifung der DZ darstellt [43, 44, 133]. In diesen zitierten Arbeiten wurde gezeigt, daß GM-CSF alleine das Überleben von hochangereicherten LZ in Kultur sichert. Hieraus muß geschlossen werden, daß eine massive Toxizität dieser Anti-TNF- $\alpha$  V1q und Vasalli vorliegt, und sie somit für meine in vitro-Experimente nicht geeignet sind.

### Ansätze zum besseren Eindringen der Antikörper ins Gewebe

Nach Auslotung sämtlicher Parameter, die noch einen Einfluß auf die Migration haben könnten (Lipopolysaccharid-TNF- $\alpha$ -Kaskade) stellte sich zunehmend die Frage, ob die Zytokine bzw. Anti-Zytokine schnell genug an ihren Wirkort, d.h. aus dem Kulturmedium in die Dermis und insbesondere in die Epidermis gelangen konnten.

Das prinzipielle Eindringen hochmolekularer Substanzen bewies ich mit dem Auflegen einer Ohrhälfte auf ein Medium/Antikörper-Gemisch (Klasse II-Antikörper B21/2, 1:1 Gemisch) für einen Tag unter gleichen Bedingungen wie die Organkultur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach Anfertigung von „sheets“ aus dieser Ohrhälfte und Färbung derselbigen nur mit den Sekundärreagenzien (biotinylierter anti-Ratten-Ig-Antikörper und Streptavidin FITC-Konjugat), konnte eine eindeutige Anfärbung der DZ sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis beobachtet werden (Abb.10). Dieser Befund bewies zwar, daß Antikörper (d.h. ca.150.000 D Molekulargewicht) in das Organ eindringen können, doch die Geschwindigkeit dieses Vorganges ist damit noch unklar. Um den im Medium befindlichen Antikörpern die Möglichkeit zu geben, durch Diffusion an den Wirkort zu gelangen bevor die Migration voll in Gang gesetzt wurde, wurden die Organkulturen für einige Stunden (2-3 h) in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Hierdurch sollte die Migration vorübergehend gehemmt werden, während die Diffusion des Antikörpers durchaus stattfinden konnte (siehe Tab. IV.11). Für diese Experimente wurde der kommerzielle neutralisierende Anti-murin TNF Antikörper von Innogenetics verwendet.

Tab.IV.11:

<b>LPS-resistente C3H-Mäuse</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	12.400	4.200	<b>34</b>
		d1-d2	15.300	9.400	<b>61</b>
		d2-d3	19.700	14.800	<b>75</b>
	TNF- $\alpha$ 500 U/ml	d0-d1	16.700	5.900	<b>35</b>
		d1-d2	17.500	10.700	<b>61</b>
		d2-d3	16.400	11.600	<b>71</b>
	Anti-TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	12.200	5.600	<b>46</b>
		d1-d2	15.400	11.700	<b>76</b>
		d2-d3	13.000	9.900	<b>76</b>

<b>LPS-resistente C3H-Mäuse</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d1	8.600	3.200	37
		d1-d2	9.600	5.700	59
		d2-d3	13.600	9.700	71
	TNF- $\alpha$ 500 U/ml	d0-d1	9.600	3.800	40
		d1-d2	9.100	5.300	58
		d2-d3	16.700	11.200	67
	Anti-TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	7.300	3.100	42
		d1-d2	12.200	6.500	53
		d2-d3	11.900	8.900	75
<b>normale C3H-Mäuse</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d1	8.600	4.400	51
		d1-d2	10.100	5.700	56
		d2-d3	9.400	5.700	61
	TNF- $\alpha$ 500 U/ml	d0-d1	8.200	4.200	51
		d1-d2	12.600	8.000	63
		d2-d3	11.100	6.100	55
	Anti-TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d1	10.300	3.900	38
		d1-d2	12.500	8.000	64
		d2-d3	10.100	5.200	51

Legende: Ges.: Gesamtzahl der von Tag 0-Tag 1, von Tag 1-Tag 2, und von Tag 2-Tag 3 ausgewanderten Zellen.  
 DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ  
 %DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

Die auffallend niederen Zellzahlen am Tag 1 könnten von der 3 - stündigen Inkubation im Kühlschrank herrühren. Diese sollte eine Hemmung der Migration bewirken, während durch Diffusion von Anti-TNF- $\alpha$  dieser an seinen Wirkort gelangen konnte. Wie später gezeigt wird (siehe Kap.V.), neutralisiert dieser Antikörper im Bioassay wirkungsvoll das Zytokin TNF- $\alpha$ . Eine Wirksamkeit des Anti-TNF- $\alpha$  im Sinne einer Hemmung der Migration ist aber auch jetzt nach Optimierung des Systems nicht erkennbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß von sechs getesteten neutralisierenden Anti-TNF  $\alpha$  Antikörpern zwei (V1q, Vasalli) eine

toxische Wirkung zeigten. Drei weitere Antikörper (Genzyme, Lemania, 1F3F3) hatten keine Wirkung auf die Migration von DZ. Diese drei Antikörper wurden allerdings nicht auf ihre Blockierwirkung im L 929 Assay ausgetestet. Lediglich der Antikörper von Innogenetics/Bender wurde parallel zum eigentlichen Experiment sowohl positiv (auf BlockierKapazität) als auch negativ (auf Toxizität) kontrolliert. Auch er hatte keinen Einfluß auf das Wanderverhalten der DZ. Die Ursache dafür ist unklar.

Entweder gelangt der Anti-TNF- $\alpha$  trotz Inkubation im Kühlschrank nicht oder viel zu spät an seinen Wirkort, oder er gelangt zwar dorthin, der erwartete Effekt ist jedoch durch Anti-TNF- $\alpha$  nicht auslösbar, weil TNF- $\alpha$  zumindest nicht allein ursächlich für die Migration der DZ ist. Um diese Überlegung weiter einkreisen zu können, mußte vorerst abgeklärt werden, ob nicht andere Antizytokine im Organkultursystem eine Hemmung der Migration bewirken könnten.

#### **b) Zugabe von Anti-IL-1 $\beta$ (Goat-anti-mouse IL-1 $\beta$ , Genzyme)**

Basierend auf der vorhandenen Literatur [131] testete ich einen kommerziellen Antikörper gegen IL-1- $\beta$  (Genzyme)(siehe Tab.IV.12).

Tab.IV.12:

<b>C3H-Mäuse im klassischen System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d2	31.200	11.600
	IL-1 $\beta$ 20 U/ml	d2	32.600	11.400
	Anti IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ g/ml	d2	34.400	11.100

<b>C3H-Mäuse im klassischen System</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	d2	29.500	13.100
	Anti IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ g/ml	d2	22.000	9.500

Legende:Ges.:Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

Die verwendeten Zytokine sowie deren genaue Dosierungen sind in der Tabelle angeführt.

Da auch diese Experimente auf keine Wirksamkeit der Zytokine schließen lassen, erhärtet sich der Verdacht, daß der Migrationsstimulus mit Abschneiden der Ohren gesetzt wurde und durch Beifügen der Zytokine bzw. Antikörper gegen Zytokine zum Medium kein verstärkender oder hemmender Effekt mehr bewirkt werden kann. Sollte es sich um eine parakrine Signalform handeln, so liegt die Möglichkeit nahe, daß der Migrationsstimulus unmittelbar nach dem Abschneiden der Ohren gesetzt wird. Das Eindringen von Zytokinen und Antikörper gegen Zytokine durch Diffusion wäre somit ein viel zu langsamer Mechanismus, bei dem weiters nicht bekannt ist, ob es auf diese Weise überhaupt möglich ist, daß diese Moleküle an ihre spezifischen Wirkorte (d.h.Zytokinrezeptoren) gelangen, die ja in diesem Fall auf der Oberfläche von eng aneinanderliegenden benachbarten Zellen lokalisiert sind.

Aufgrund dieser Überlegungen testete ich ein Kombinationssystem, ein „in vivo - in vitro“ System aus.

### **3.3 Ein *in vivo/in vitro* Kombinationssystem**

In Anlehnung an die Beobachtungen von Enk & Katz [131], sowie aufgrund des Verdachts, daß in meinem Organkultursystem die dem Medium zugefügten Zytokine nicht sicher und vor allem nicht schnell genug an ihren Wirkort gelangen können, begann ich, die verschiedenen Zytokine intradermal in die Mäuseohren zu injizieren.

#### **a) Spezielle Methodik:**

Die Zytokine werden in einer 1ml-Spritze aufgezogen, wobei ein Volumen von 50µl pro Mäuseohr berechnet wird [131]. Ich verwendete folgende Zytokine:

- murines Interleukin-1β 30ng (Genzyme Corp., Cambridge, MA) in 50µl sterilem PBS verdünnt
- Anti-murines Interleukin-1β 20µl (1mg/ml Endkonzentration) (Genzyme) in 50µl sterilem PBS. Diese hohe Dosierung begründet sich aus dem Wissen, daß große Mengen von Interleukin-1β in den DZ exprimiert werden [95, 129, 130].
- murines Interleukin-1α 30ng (Genzyme) in 50µl sterilem PBS/Ohr
- Anti-murines Interleukin-1α 20µl (1mg/ml) (Genzyme) in 50µl sterilem PBS
- muriner TNF-α 1000 U oder 500 U/Ohr/50µl sterilem PBS
- humaner TNF-α (von Dr. GR Adolph, Bender Ges.m.b.H, Wien; 4x10<sup>7</sup> U/mg spezifische Aktivität) 500 U/Ohr/50µl sterilem PBS
- muriner GM-CSF 1000 U/Ohr/50µl sterilem PBS

Nach Narkotisierung der weiblichen 6-8 Wochen alten Balb/c-Mäuse mit Äther wurde jeweils das rechte Ohr über ein Röhrchen gezogen, damit es straff gespannt war, und in einem sehr flachen Winkel mit der Spitzenschräge einer sehr dünnen Subcutannadel nach unten von proximal dorsal in das Ohr eingestochen. 30-40µl können somit problemlos injiziert werden, wobei ein Verlust von etwa 10µl berechnet wurde. Die hierbei entstehende Quaddelbildung an der dorsalen Ohrseite bietet eine gute Kontrolle für den Erfolg der Injektion. In jedes linke Ohr spritze ich zur Kontrolle 30-40µl steriles PBS. Ein direkter Seitenvergleich ermöglicht exaktere Angaben über die Wirksamkeit der Zytokine und grenzt Fehlerquellen aufgrund individueller Unterschiede weitgehend aus. Je 4 Mäuse wurden pro Versuchsansatz mit den gleichen Zytokinen versehen.

Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die Ohren abgeschnitten und nach Desinfektion in Alkohol die dorsalen Ohrhälften in der Organkultur aufgelegt (in 24-well-Gewebekulturplatte mit 1,5ml Kulturmedium R10/well; siehe Kap.II Organkultur). Nach weiteren 18 Stunden wurden die Ohrhälften entnommen und zu „sheets“ weiterverarbeitet und gefärbt (Siehe Kap.II Herstellung und Färbung der epidermalen und dermalen „sheets“). Der Überstand aus der Kultur wurde gepoolt, zentrifugiert und die Zellen im Hämocytozometer gezählt. Dies ist nach dieser kurzen Kulturzeit aufgrund des geringen Reifungsgrades der DZ nur mit geübten Auge möglich. Die typischen Zytoplasmasegel sind noch nicht voll ausgebildet. Die Zuverlässigkeit der Hämocytozometer-Befunde bestätigte ich in einigen Experimenten mittels anti-MHC-Klasse II Färbungen auf Zytopräparaten.

#### b) Versuche/Ergebnisse:

Die hier angeführten Versuche (Tab.IV.13) wurden alle nach der oben beschriebenen Methode angesetzt und ausgewertet:

Tab.IV.13:

<b>Balb/c</b>				
<b>Exp.1</b>	<b>intradermale Injektion</b>	<b>Kulturdauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
	IL-1β 30ng	18h	52.100	28.000
	PBS-Kontrolle	18h	51.300	19.900
	Anti-IL-1β 20µl	18h	33.300	11.200
	PBS-Kontrolle	18h	47.600	20.300

<b>Balb/c</b>				
<b>Exp.2</b>	<b>intradermale Injektion</b>	<b>Kulturdauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
	IL-1 $\beta$ 30ng	18h	49.000	16.400
	Anti-IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ l	18h	35.600	6.000
	PBS-Kontrolle	18h	38.200	10.000
	TNF- $\alpha$ 1000 U/Ohr	18h	40.600	14.300
	GM-CSF 1000 U/Ohr	18h	48.300	11.900
	PBS-Kontrolle	18h	37.900	11.300

<b>Balb/c</b>				
<b>Exp.3</b>	<b>intradermale Injektion</b>	<b>Kulturdauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
	IL-1 $\beta$ 30ng	18h	80.600	19.900
	Anti-IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ l	18h	67.800	12.000
	PBS-Kontrolle	18h	80.100	16.000
	IL-1 $\alpha$ 30ng	18h	26.200	10.600
	Anti-IL-1 $\alpha$ 20 $\mu$ l	18h	29.400	12.600
	PBS-Kontrolle	18h	27.200	9.500

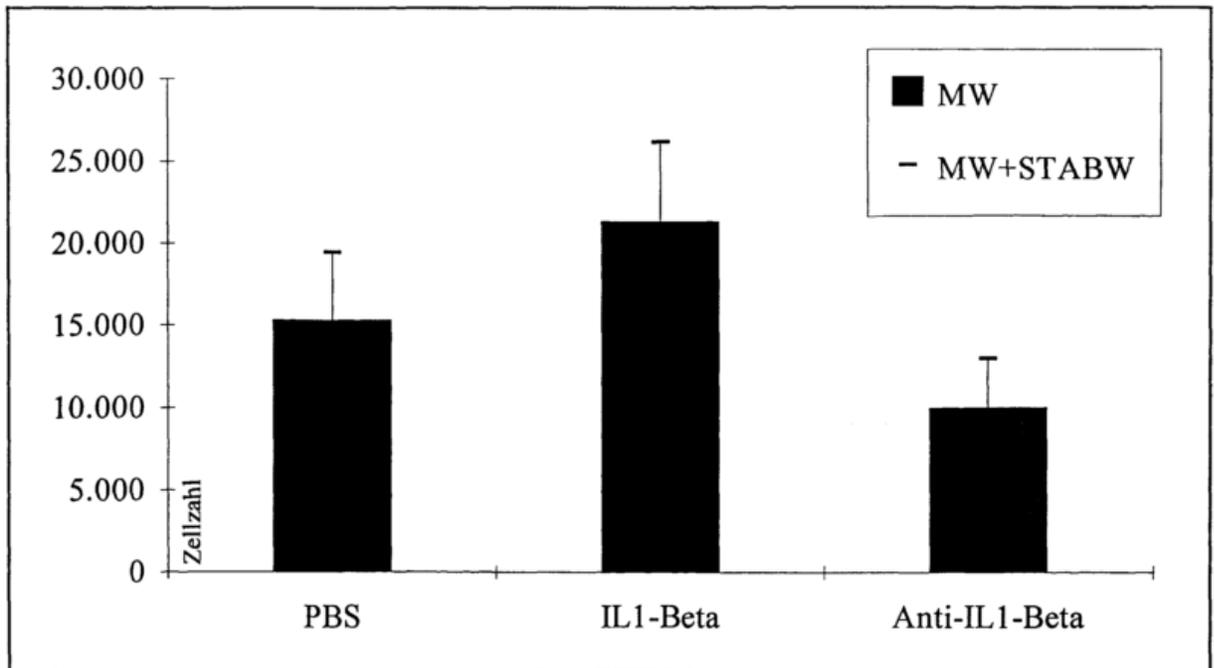
Legende: Ges.: Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen  
 DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

In allen 3 Versuchen ist die Tendenz trotz großer Schwankungen der Zellzahlen die Gleiche: *Interleukin-1 $\beta$  kann die Migration der DZ verstärken, während Anti-Interleukin-1 $\beta$  eine teilweise Reduktion der Migration bewirkte.* Zur besseren Veranschaulichung habe ich diese Ergebnisse in der Graphik IV.1 dargestellt.

Um im Weiteren die Unterschiede der Zellzahlen stärker herauszuarbeiten, setzte ich in der Organkultur die Zytokine in der gleichen Dosierung noch einmal bei als ich sie vorher in vivo schon gespritzt hatte. Diese Beigabe der Zytokine zum Medium in der Organkultur erbrachte jedoch keinen verstärkenden Effekt, was als weiterer Hinweis auf die Unwirksamkeit der Zytokine in der Organkultur gewertet werden kann (siehe Tab.IV.14). Die Ursache für die teilweise außergewöhnlich hohen Zahlen von ausgewanderten DZ pro Ohrhälfte ist ungeklärt.

## Graphik VI.1:

## Darstellung der Wirksamkeit der gespritzten Zytokine:



Legende: MW: Mittelwert  
STABW: Standardabweichung

## Tab.IV.14:

## Vergleichsversuch mit und ohne Zugabe der Zytokine zur Kultur

Balb/c				
Exp.1	intradermale Injektion	Kulturdauer	Ges.	DZ
	IL-1 $\beta$ 30ng	18h	n.gez.	65.400
	Anti-IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ l	18h	n.gez.	43.500
	PBS-Kontrolle	18h	n.gez.	50.400

Balb/c				
versus	intradermale Injektion + Zugabe zu Kultur	Kulturdauer	Ges.	DZ
	IL-1 $\beta$ 30ng	18h	88.100	55.500
	Anti-IL-1 $\beta$ 20 $\mu$ l	18h	58.300	40.300
	PBS-Kontrolle	18h	71.100	46.300

Legende: n.gez.: Diese Zellzahlen wurden aufgrund einer hohen Anzahl von Erythrozyten nicht erhoben.

Aus allen Versuchen wurden epidermale „sheets“ hergestellt und gefärbt, um die Zählergebnisse aus dem Hämozytometer zu bestätigen, d.h. um eine Zunahme von ausgewanderten DZ mit einer Abnahme von erkennbaren LZ in der Epidermis korrelieren zu können und umgekehrt. Dies war jedoch nicht möglich, da aus allen Ohrhälften DZ ausgewandert waren und die Unterschiede der ausgewanderten Zellzahlen zu gering war, um sie in den „sheets“ deutlich zu erkennen.

Eine neu erschienene Arbeit von Cumberbatch & Kimber [93] favorisiert murinen TNF- $\alpha$  als Migrationsstimulus beruhend auf Experimenten mit intradermaler Verabreichung von Zytokinen. Dagegen bewirkte eine Injektion von humanem TNF- $\alpha$  sowie von GM-CSF keine Reduktion der DZ-Zahlen in den epidermalen „sheets“. Deshalb untersuchte ich auch diesen Ansatz, wobei ich meine oben genannten Dosierungen der Zytokine beibehielt.

Hierfür bediente ich mich des gleichen Systems wie Cumberbatch & Kimber, welche schon kurze Zeit nach intradermaler Injektion der Zytokine in die Ohren, diese abschnitten und sofort zu „sheets“ verarbeiteten und färbten. Sie beschreiben nach mTNF- $\alpha$  Injektion eine, bereits nach 30 min vorhandene, Reduktion der DZ-Zahl in den epidermalen „sheets“, welche nach Injektion von humanem TNF- $\alpha$  oder murinem GM-CSF nicht vorhanden war. Ein Effekt von IL-1 $\beta$  [131] wird von ihnen nicht untersucht.

Somit injizierte ich murines IL-1 $\beta$  (30ng), murinen TNF- $\alpha$  (500 U/Ohr), humanen TNF- $\alpha$  (500 U/Ohr) und murinen GM-CSF (500 U/Ohr) in alle rechten Ohren, während in die linken Ohren steriles PBS injiziert wurde. Nach 30 min tötete ich die Mäuse, um die Ohren abzuschneiden und die epidermalen „sheets“ herzustellen und zu färben.

Die Auszählung der, mittels eines geeichten Objektmikrometers kalibrierten, 10 Zählfelder/„sheet“ ergab folgendes Ergebnis (siehe Tab.IV.15): Bereits nach 30 min ist eine deutliche Reduktion der DZ-Zahl in den mTNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gespritzten „sheets“ zu erkennen, die auch ohne Auszählung der „sheets“ augenscheinlich wird. Die in der Epidermis verbleibenden DZ werden größer, ausgezogener und besitzen einen dickeren, deutlicheren Zelleib. Das morphologische Erscheinungsbild entspricht etwa den aus der Organkultur bekannten Tag 1-„sheets“ (Abb.1). Doch auch mit humanem TNF- $\alpha$  und im geringeren Maße auch mit GM-CSF ist, entgegengesetzt zu den Beobachtungen von Cumberbatch & Kimber, eine Reduktion der DZ-Zahl zu erreichen, während die Injektion von sterilem PBS keine DZ-Zahl Reduktion im Vergleich zu „sheets“ von einem unbehandelten Ohr bewirkt (vgl.Tab.II.1). Diese Tatsache beweist, daß die DZ-Zahl-Reduktion als direkte Wirksamkeit der Zytokine zu

betrachten ist und nicht einen allein auf Irritation durch die Spritzmanipulation zurückzuführender Effekt darstellt.

Tab.IV.15:

<b>Balb/c</b>			
<b>gespritztes Zytokin</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Reduktion in %</b>
PBS-Kontrolle	798	+/- 88	0%
IL-1 $\beta$ 30ng	398	+/- 59	50%
mTNF- $\alpha$ 500 U/Ohr	446	+/- 64	44%
hTNF- $\alpha$ 500 U/Ohr	485	+/- 79	39%
GM-CSF 500 U/Ohr	597	+/- 60	25%

Legende: Mittelwert: Der aus den Zählergebnissen aus 10 Zählerfeldern errechnete Durchschnittswert  
Standardabweichung: Variationsbreite dieser 10 Zählerfelder

Eine letzte Versuchsreihe im kombinierten in vitro/in vivo System führte ich mit zwei zusätzlichen Reagenzien durch, die Zytokine bzw. deren Rezeptoren auf effektivere Weise als die bislang eingesetzten Moleküle hemmen. Erstens verwendete ich einen *Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten*. Dieses kleine Molekül hat eine hohe Affinität zum IL-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Es kann bei entsprechend hoher Konzentration sogar mit dem bereits an den Rezeptor gebundenen Zytokin konkurrenzieren und es verdrängen. Das können Anti-Zytokinrezeptor Antikörper nicht. Das Reagenz erhielten wir von Dr. D. Carter von der Fa. Upjohn, Kalamazoo, MI. Es ist primär gegen den humanen IL-1 Rezeptor gerichtet, reagiert aber kreuz mit murinen IL-1 Rezeptoren. Ein  $\mu\text{g}$  der Substanz wurde pro Ohr i.d. gespritzt. Nach einer Stunde wurden die Ohren abgeschnitten und die Hälften in die Organkultur gebracht die ebenfalls den Antagonisten enthielt (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration). Zweitens setzte ich ein gegen TNF gerichtetes Konstrukt ein. Von Dr. S. Gillis, Immunex Corporation, Seattle, WA erhielten wir ein Hybridmolekül, welches einen *löslichen TNF-Rezeptor* darstellt. Es besteht aus zwei ca. 80kD großen Stücken der extrazellulären Domäne des humanen TNF Rezeptors, die mit einem Fc-Stück des humanen Immunglobulins fusioniert sind. Dieser lösliche TNF-Rezeptor kann mit hoher Affinität TNF- $\alpha$  (auch murinen!) binden. Auch hier

wurde 1 µg pro Ohr i.d. appliziert und in der Organkultur in Gegenwart von 50ng/ml Endkonzentration 16 Stunden lang weiterkultiviert.

Tabelle VI.16 zeigt erneut das Phänomen, daß rekombinantes IL-1β die Zahl der ausgewanderten DZ auf das Doppelte steigert. Der IL-1 Rezeptor-Antagonist hatte jedoch keine Wirkung. Ebenso wenig veränderte die Verabreichung des löslichen TNF-Rezeptors die Zahl der ausgewanderten DZ.

Tab. VI.16:

<b>Balb/c</b>				
<b>Exp.1</b>	<b>intradermale Injektion</b>	<b>Kulturdauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
	IL-1β 30ng	16h	62.600	20.500
	IL-1β-Antagonist 1µg/Ohr	16h	19.00	9.000
	PBS-Kontrolle	16h	20.400	10.200
	TNF-α 1000 U/Ohr	16h	28.600	14.700
	lösl.TNF Rezeptor 1µg/Ohr	16h	25.400	10.000

Legende: Ges.:Gesamtzellzahl der von Tag0- Tag3 ausgewanderten Zellen  
DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

#### **4.)Diskussion:**

##### **Methodische Ansätze zum Studium der Migration von dendritischen Zellen.**

Beim Vergleich von Daten zur DZ Migration ist zu beachten, daß verschiedene Autoren unterschiedliche experimentelle Systeme anwenden. Die ersten Studien, die Hinweise auf eine Auswanderung von epidermalen LZ gaben, wurden im System der Kontakthypersensitivität gemacht [80, 81, 122]. Nach epikutaner Applikation von Kontaktallergenen verringerte sich in der Epidermis die Zahl der immunhistochemisch nachweisbaren LZ. Die Korrelation dieser z.T. schon klassischen Studien [80] mit rezenten Analysen der Zytokinexpression unter Bedingungen der Kontakthypersensitivität [95] führte zum "Verdacht" daß IL-1 $\beta$  ein entscheidendes Zytokin bei der Wanderung sein könnte [131]. In diesen Studien wurde jedoch nicht die dermale Komponente untersucht, obwohl bekannt ist, daß es - den epidermalen LZ analoge - dermale DZ gibt [22, 143], und daß diese dermalen DZ auch bei der Entstehung von Kontakthypersensitivität beteiligt sind [65, 66].

Die Gruppen um Enk & Knop in Mainz sowie um Kimber & Cumberbatch in England spritzen Zytokine intradermal und untersuchen epidermale Sheets. Auch dabei werden die Vorgänge in der Dermis ungenügend berücksichtigt. Der Vorteil ist aber, daß die Zytokine direkt in loco deponiert werden.

Das von Larsen et al. [82] etablierte Organkulturmodell erlaubt eine breitere Analyse der Vorgänge. Durch die leichte Herstellung von dermalen Sheets können zelluläre Vorgänge in der Dermis beobachtet werden wie z.B. in Kapitel III gezeigt. Zudem kann die Wanderung direkt an der Zahl der ins Medium emigrierten Zellen gemessen werden. Mit den drei von mir eingeführten erweiternden Modifikationen (1. zeitliche Aufgliederung der Kultur; 2. Verringerung des initialen Stimulus durch verlängerte Abliegezeit - "getriggertes System"; 3. Kombination von intradermaler Injektion und Kultur) kann das System in weiterführenden Experimenten zusätzliche Aufschlüsse geben.

##### **Die Rolle der Zytokine bei der Migration von dendritischen Zellen.**

Die hier präsentierten Daten geben keine klare Antwort, welches oder welche Zytokine ursächlich für die Migration verantwortlich sind. Aus den zahlreichen Experimenten mit unterschiedlichen Variationen des Organkulturmodells und unter Verwendung verschiedener Zytokine und anti-Zytokin-Reagenzien kristallisierte sich ein Trend klar heraus: *Interleukin-1 $\beta$*  zeigt eine fördernde Wirkung auf die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen.

Dies bestätigt und komplementiert Daten, die von anderen Gruppen in anderen experimentellen Systemen erhoben worden sind [131].

Eine Tatsache wiederholt sich jedoch in den unterschiedlichen Versuchsansätzen: Sobald es gelang, durch eine "Triggerung" (vgl. Tab IV.7) oder eine Injektion (vgl. Tab. IV.15) einen Effekt auf die Migration zu erzielen, zeigten immer mehrere Zytokine - wenn auch in unterschiedlicher Stärke - diese Wirkung. Das macht es sehr wahrscheinlich, daß nicht ein einzelnes Zytokin, sondern eine Kaskade von sich gegenseitig beeinflussenden Zytokinen zum Phänomen der Migration führt.

Interleukin-1 ist sicherlich ein Schlüsselzytokin. Rezente Daten [129, 131] lassen uns folgende Hypothese formulieren: Auf einen antigenen Reiz hin (z.B. Kontaktallergen) reagieren die Keratinozyten der Epidermis mit der Ausschüttung von IL-1- $\alpha$  [131]. Dieses Zytokin bindet an die IL-1 Rezeptoren der LZ. Kämpgen et al. haben kürzlich gezeigt, daß frisch isolierte murine LZ diese Rezeptoren exprimieren [53]. IL-1- $\alpha$  löst in den LZ die Reifung aus, indem es die Expression von GM-CSF Rezeptoren auf LZ induziert [53]. GM-CSF ist im epidermalen Milieu vorhanden, da es von Keratinozyten produziert wird. Im Zuge der Reifung produzieren die LZ nun auch große Mengen von IL-1 $\beta$  [129]. Das könnte vielleicht in autokriner Weise zur Migration führen; dafür sprechen meine Daten sowie die von Enk et al. [131]. Dagegen spricht aber, daß IL-1 $\beta$  Synthese nur auf der Ebene der mRNA nachgewiesen wurde [129], nicht aber auf Proteinebene. Es ist also nicht klar, ob dieses Zytokin auch wirklich gebildet und - vor allem - auch wirklich sezerniert wird.

Enk et al. argumentieren etwas unterschiedlich. Für sie geben die LZ den Startschuß zur Kaskade von Ereignissen in Antwort auf den antigenen Reiz. Beruhend auf ihren Experimenten, bei denen sie IL-1 $\beta$  intradermal iniziert haben, postulieren sie, daß IL-1 $\beta$  die Keratinozyten erst dazu bringt, IL-1- $\alpha$  sowie TNF zu produzieren [131]. Auch hier gilt aber wieder das "Caveat", daß nicht gezeigt worden ist, daß IL-1 $\beta$  tatsächlich sezerniert wird. Auch ist bei ihren Experimenten nicht ganz verständlich, warum IL-1 $\beta$  so selektiv wirkt, da doch bekannt ist, daß beide Arten von IL-1 an gleiche Rezeptoren binden können.

TNF- $\alpha$  hatte in meinem System nur beschränkte Wirkung. Im identen Ansatz wie Cumberbatch et al. [93] konnte ich auch deren Resultate reproduzieren: Verringerung der LZ Zahl nach i.d. Injektion des Zytokins. Ich fand aber keine erhöhte Auswanderung von DZ. Das könnte auf differentielle Wirkungen des Zytokins auf das epidermale und dermale Kompartiment schließen lassen. Ich habe diese Frage nicht untersucht. Das Organkulturmodell bietet aber eine gute Möglichkeit, das zu tun. Epidermis und Dermis

können nämlich mittels des Enzyms Dispase voneinander getrennt werden und separat kultiviert und untersucht werden [22].

Ein essentieller nächster Schritt bei der Fortführung der Studien im Organkulturmodell wird deshalb eine begleitende *Analyse der Zytokinproduktionsmuster*, getrennt nach Dermis und Epidermis sein. Dies wird im Screening mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gemacht werden. Das sollte wichtige Hinweise darauf geben, welche Cocktails von Zytokinen während der mehrtägigen Kultur im Organ vorhanden sind. Einen ersten Versuch dazu habe ich - auf Proteinebene - mit dem TNF-Bioassay gemacht, der in Kapitel V beschrieben ist, und der zeigt, daß - wenn überhaupt - in den Organkulturen nur geringste Mengen dieses Zytokins nachweisbar sind.

### **Die Rolle anderer Faktoren bei der Migration von dendritischen Zellen.**

*Adhäsionsmoleküle* regulieren die Haftung von Zellen im Gewebeverband und die Wanderung von Zellen durch Gefäßwände [107-109]. Ihre Expression wird in hohem Maße durch Zytokine gesteuert. Es ist deshalb anzunehmen, daß auch im Falle der Migration von DZ aus der Epidermis durch die Dermis in die lymphatischen Gefäße und (bei der Kultur) weiter ins Kulturmedium diese Moleküle entscheidende Rollen spielen. Rezente Arbeiten geben indirekt davon Evidenz. Auf frisch isolierten epidermalen LZ (entsprechend residenten DZ) und kultivierten epidermalen LZ (entsprechend wandernden DZ) werden Adhäsionsmoleküle differentiell exprimiert. Während der Epidermalzellkultur wird auf den LZ die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54 [35, 86], LFA-3/CD58 [48], alpha-4 Integrin/VLA-4/CD49d [31, 105, Lenz et al., unveröffentlichte Daten] hochreguliert. Herabreguliert werden dagegen E-Cadherin und das kutane Lymphozyten Homing Antigen CLA, erkannt durch den mAk HECA-452 [Lenz et al., unveröffentlichte Daten]. Es wird notwendig sein, die Expression dieser Moleküle und insbesondere deren physiologischer Liganden auch im Organkultursystem zu studieren.

Die Rolle von *Mediatoren des Nervensystems* auf Zellen und Vorgänge des Immunsystems, insbesondere des kutanen Immunsystems, ist weitgehend unbekannt. Eine rezente Arbeit beschreibt einen Einfluß des CGRP (calcitonin-gene-related-peptide) auf die immunologischen Funktionen von epidermalen Langerhanszellen [70]. In meinen Experimenten zeigte das kürzlich erstmals beschriebene Neuropeptid Sekretoneurin [140] keinen Einfluß auf Funktion und Migration der kutanen DZ. Die Tatsache aber, daß auch dieses Peptid im sogenannten "getriggerten System", das heißt in der Organkultur nach längerer Abliegezeit im Kühlschrank, zu einer Zunahme der DZ Wanderung führte, spricht

dafür, daß es doch - möglicherweise in hier nicht getesteten Kombinationen mit anderen Zytokinen - regulierend auf die von der Haut ausgehenden Immunantworten wirkt.

### **Klinische Relevanz von Migrationsstudien.**

Die Wanderungsfähigkeit ist eines der spezifischsten Merkmale für dendritische Zellen. Selbst wenn unter bestimmten experimentellen Bedingungen B Zell Linien auch in der Lage wären, ruhende T Lymphozyten zu stimulieren oder gut native Proteinantigene zu prozessieren, so fehlt ihnen doch die entscheidende Eigenschaft, nämlich mit dem Antigen in die lymphatischen Organe zu migrieren. Nur dort nämlich besteht eine reelle Chance, daß die antigenpräsentierende Zelle auch auf T Zellen mit "passenden" T Zell Rezeptoren trifft. Werden verschiedene antigenbeladene, antigenpräsentierende Zellen z.B. in die Fußpfote einer Maus gespritzt, so können nur DZ in die T Zell Areale der regionären Lymphknoten, oder bei i.v. Injektion, in die Milz wandern [54]. Das kann direkt auch in vivo bei experimenteller Transplantation beobachtet werden [79].

Es wäre also wünschenswert, die migratorische Kapazität von kutanen DZ beeinflussen zu können. Das könnte zur Unterdrückung von kontaktallergischen Vorgängen therapeutisch genutzt werden. Ebenso wäre dies bei der Kontrolle der Transplantatabstoßung sinnvoll [20, 79]. Die rezenten Entwicklungen auf dem Gebiet der Züchtung von proliferierenden DZ aus dem Blut [55] oder Knochenmark [54] lassen die Möglichkeiten für die adoptive Immuntherapie von Tumoren mit Hilfe von DZ, die tumorspezifische Peptide [145] präsentieren, realistisch erscheinen. Wenn also mit Tumorpeptid beladene, in vitro expandierte, autologe DZ den Patienten verabreicht werden, so ist es entscheidend, daß diese DZ damit in die lymphatischen Organe gelangen, um dort die Immunantwort gegen den Tumor einzuleiten. Das Wissen über die Regulation der Migration ist deshalb bei diesen Therapieansätzen sehr wichtig.

Eine weitere klinisch wichtige Anwendung von Daten über die Migration von DZ liegt im Bereich der Allergologie. Migrationsassays wären vorstellbar, in denen die sensibilisierende Potenz von unbekanntem Substanzen getestet werden könnte. Die Auswanderung von kutanen DZ, so wie hier und im Humansystem [22] gezeigt worden ist, würde dabei als Read-Out dienen.

# V. TNE-alpha Zytotoxizitätsassay

Abbildung: 10



## V. TNF-alpha Zytotoxizitätsassay

### 1.) Einleitung:

Mehrere Untersuchungen [91, 92, 120] weisen in die Richtung, daß TNF- $\alpha$  das verantwortliche Zytokin für die Migration sein könnte. Meine bisherigen Untersuchungen im Organkulturmodell konnten diese Aussage aber nicht bestätigen. Deshalb strebte ich eine Kontrollmöglichkeit an. Ich versuchte den vermuteten TNF- $\alpha$  in den Überständen meiner Organkultur nachzuweisen. Dazu habe ich vorerst etliche Überstände aus meinen Organkulturen am d1, d2 und d3 steril abgesammelt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Messung des TNF- $\alpha$  Gehaltes der Überstände bediente ich mich eines sensitiven Standard-Zytotoxizitätstests mit L929-Zellen [146], der jedoch in diesem Labor noch nicht etabliert war. Aus diesem Grund folgt nun eine genauere Beschreibung dieses Zytotoxizitätsassays, der über 3 oder über 5 Tage (ohne Aktinomycin) angesetzt werden kann. Nachdem die 3-Tage-Technik einerseits die Schnellere, andererseits auch die Sensitivere ist, habe ich nur diese verwendet.

## **2.)Material und Methode:**

**Material:** Kulturmedium R 10 ( siehe Kap. I )

Aktinomycin D (Sigma):

-Verdünnung in PBS zu 20µg/ml (ev. bessere Auflösung bei 37°C)

Einfrieren in 5ml-Portionen bei -20°C

-Nach auftauen, Verdünnung mit Kulturmedium

zu 2µg/ml (diese Lösung hält ca. 14 Tage im Kühlschrank bei 4°C)

Kristallviolett (Sigma): 0,5%-ig verdünnt in Aqua dest.

5%-iges Formaldehyd

33%-ige Essigsäure (Sigma)

L929-Zellen ( Tumorfibroblasten der Maus )

muriner rec. TNF-α (Dr.Gr.Adolf, Bender & Co Ges.mbH Wien)

muriner rec. Anti-TNF-α (Innogenetics, Bender & Co Ges.mbH Wien)

### **Methode:**

#### **Tag 1: Ausplattieren der L929-Zellen**

- Nach Aufzucht der eingefrorenen L929-Zellen in Gewebekulturpetrischalen werden diese für den Zytokinassay ausgeplatet. In einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte werden 50µl/well L929-Zellen blasenfrei ( Pipette nur bis zum Anschlag entleeren ) in einer Konzentration von  $4,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät.
- Unmittelbar nach dem Aussäen der L929-Zellen muß die 96-well-Mikrotiterplatte ca. 30 Sekunden mit einem Schüttler heftig geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Anschließend erfolgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### Tag 2: Zugabe der Überstände

- Nach 20-24 Stunden ist ein gleichmäßiger Rasen von L929-Zellen am Boden der Gewebekulturplatte angewachsen. Nun können die Standardverdünnungen sowie die zu messenden Überstände dazupipettiert werden, wobei immer Triplets angelegt werden sollten. Die Standardreihe besteht aus 5 Triplets mit einer bekannten, in meinem Fall jeweils um eine Zehnerpotenz (50U; 5U; 0,5U/ml usw.) abnehmenden Konzentration von TNF- $\alpha$  in einem Volumen von 50 $\mu$ l/well.  
Auch die Überstände werden in Triplets zu 50 $\mu$ l/well ausplattiert, wobei diese, wenn hohe Konzentrationen von TNF- $\alpha$  erwartet werden, eventuell noch in Zehnerpotenzen verdünnt werden können.
- Um den Toxizitätseffekt des TNF- $\alpha$ , der zu einem Absterben der L929-Zellen führt, zu verstärken, werden nun 50 $\mu$ l/well Aktinomycin D, welches in einer Konzentration von 2-3ng/ml verdünnt wurde, dazupipettiert. Die Konzentration des Aktinomycin D hängt von der Empfindlichkeit der L929-Zellen gegenüber TNF- $\alpha$  ab und kann entsprechend variiert werden.
- Bei einem Gesamtvolumen von 150 $\mu$ l/well wird der Ansatz nun 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Tag 3: Färbung und Messung des Assays

- Nach 16-20 Stunden Inkubation wird der Inhalt jedes wells vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, wobei diese nicht den Zellrasen am Boden des wells zerkratzen darf. Hiermit werden die, durch TNF- $\alpha$  abgestorbenen und somit im Medium schwimmenden Zellen abgesaugt, während ein, von der Menge des TNF- $\alpha$  indirekt abhängiger, viabler Zellrasen bestehen bleibt.
- Die festhaftenden L929-Zellen müssen jetzt fixiert werden. Dazu wird 50 $\mu$ l/well 5%-iges Formaldehyd zugegeben, welches 10 min einwirken muß.
- Das Formaldehyd wird durch einmaliges kräftiges Ausschütten entfernt. Vorsichtig wird die Platte nun unter fließendem Wasser gewaschen, wobei die Platte annähernd parallel zum Wasserstrahl gehalten werden soll, damit kein direkt auftreffender Wasserstrahl den Zellrasen beschädigen kann.

- Durch einmaliges kräftiges Ausschütten wird das restliche Wasser entfernt und die Zellen können jetzt gefärbt werden.  
Dies erfolgt durch Auspipettieren von 25µl/well 0,5%-iger, filtrierter (um Farbklumpen zu vermeiden) Kristallviolettlösung, welche ca. 15-20 min einwirken muß.
- Anschließend wird die Platte unter fließendem Wasser gewaschen (vorzugsweise mit Handschuhen, da Kristallviolett hartnäckig die Haut färbt und gesundheitsschädlich ist), wobei wieder darauf geachtet werden sollte, daß kein direkter Wasserstrahl den Zellrasen schädigt.
- Einige Minuten sollte die Platte nun verkehrt zum Trocknen aufgelegt werden.
- Vor der Messung der nun gefärbten, überlebenden Zellen in einem Photometer sollten noch 50µl/well 33%-ige Essigsäure auspipettiert werden. Zwar ist auch eine Trockenmessung möglich, doch führt die Zugabe von Essigsäure zu einer gleichmäßigen Verteilung der Färbung, deren Intensität ja nur an einem Punkt/well gemessen wird. Die Gleichmäßigkeit der Färbung kann noch durch ein Mischen des Inhalts jedes wells mit Hilfe einer Multipipette verbessert werden.
- Nun erfolgt die Messung der Farbintensität bzw. der optischen Dichte (OD) in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die OD ist umso geringer, je mehr TNF- $\alpha$  in der zu messenden Lösung war. Je mehr TNF- $\alpha$ /well vorhanden ist, desto mehr L929-Zellen gehen zugrunde und werden abgesaugt. Somit sind umso weniger Zellen viabel und am Boden haftend und können gemessen werden.

Da in diesem Labor eine Messung bei einer Wellenlänge von 540 nm nicht möglich war, wurde mir freundlicherweise die Benützung des Photometers am Institut für medizinische Biochemie in der Fritz-Pregl Str. gestattet.

### **3.)Fragestellung:**

1. Ist TNF- $\alpha$  in nachweisbaren Mengen in den Überständen meiner Organkultur vorhanden?
2. In meinem Organkultursystem wird TNF- $\alpha$  zugefügt. Nachdem dessen Haltbarkeit als eher gering eingeschätzt wird, stellte sich die Frage, ob TNF-a im klassischen System am 3.Tag überhaupt noch vorhanden ist?
3. Nachdem die unterschiedlichsten Probleme mit den verschiedenen Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  aufgetreten sind, wollte ich hiermit die abblockende Wirksamkeit des anti-TNF- $\alpha$  einerseits, sowie dessen Nicht-Toxizität auf Zellen andererseits nochmals verifizieren.

## **4.)Versuche/Ergebnisse:**

### **4.1 TNF- $\alpha$ Nachweis in Organkulturüberständen**

In mehreren Zytotoxizitätsassays habe ich die, aus den unterschiedlichen Organkulturen gesammelten Überstände auf ihren Gehalt an TNF- $\alpha$  ausgetestet. Ich habe hier einen Test, exemplarisch für alle durchgeführten Assays, zur Demonstration des Ergebnisses angeführt (siehe Tab.V.1).

Daraus läßt sich erkennen, daß in keinem der Überstände TNF- $\alpha$  nachweisbar war. Lediglich ein Überstand von einem ungewöhnlich späten Zeitpunkt wies eine geringe Menge von TNF- $\alpha$  auf. Sollte sich TNF- $\alpha$  in geringen Mengen in den Überständen befinden, so liegen diese unter der Grenze der Nachweisbarkeit. Diese liegt bei wenigen pg/ml.

### **4.2 Wie lange ist zugefügter TNF- $\alpha$ in der Organkultur nachweisbar**

Vor allem im klassischen System wird TNF- $\alpha$  in der Kultur zugesetzt und sollte in der Lage sein, seine Wirkung über 3 Tage hinweg zu entfalten. Nachdem auch ein schneller Verbrauch oder Zerfall des TNF- $\alpha$  ursächlich für die Nichtwirksamkeit des Zytokins auf die Migration sein könnte, habe ich auch Überstände aus der klassischen Tag 0 - Tag 3-Organkultur abgesammelt und mit diesem Bioassay den TNF-a-Gehalt nach 3 Tagen gemessen.

Dabei zeigte sich, daß zwar die Menge des TNF- $\alpha$  sehr stark abgenommen hat (um ca. das 1000-fache aus einer ursprünglichen Dosierung von 500-1000 U/ml), daß TNF- $\alpha$  aber auch nach 3 Tagen noch eindeutig nachweisbar und meßbar war (siehe Tab.V.1).

### **4.3 Austestung von Anti-TNF- $\alpha$ im Zytotoxizitätsassay**

Es hat sich wiederholt gezeigt, daß auch die Möglichkeit besteht, daß Anti-Zytokine nicht nur durch ihre Hemmung wirksam sein können, sondern daß ihre Konservierung z.B.in sauren Milieu durch Toxizität an den Zellen eine Hemmung des Migrationssystems vortäuschen kann.

Die Anti-TNF- $\alpha$  V1q und Vasalli hatte ich schon mit einer anderen Technik ausgetestet, den kommerziellen rekombinanten goat anti mouse TNF- $\alpha$  (Innogenetics, Bender, Wien) testete ich mit Hilfe dieses Zytotoxizitätsassays aus. Dafür inkubierte ich 0,5 ml TNF- $\alpha$  Medium

(500 U/ml) mit 0,5 ml Anti-TNF- $\alpha$  (5000 neutralisierende U/ml; ein 10-facher Überschuß) eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Damit gab ich dem Anti-TNF- $\alpha$  die Möglichkeit, sämtliche TNF- $\alpha$ -Moleküle abzublocken. Anschließend gab ich je 50 $\mu$ l/well dieser Lösung zu den am Vortag auspipettierten L929-Zellen (siehe: Methode des Zytotoxizitätsassays). Weitere wells wurden mit 50 $\mu$ l einer reinen Anti-TNF- $\alpha$ -Lösung versehen. So konnte ich 2 Ergebnisse gleichzeitig erfassen (siehe Tab.VI.1)

- Ob ein 10-facher Exzeß sämtliche TNF- $\alpha$ -Moleküle abblocken kann,
- Ob der Anti-TNF- $\alpha$  per se eine toxische Wirkung entfaltet

#### Ergebnis:

1. Aus diesem Ansatz konnte man erkennen, daß ein 10-facher Überschuß des Antikörpers genügt, um den TNF- $\alpha$  bis an die Grenze der Nachweisbarkeit abzublocken
2. Die Zugabe des Antikörpers zum Medium führt zu keiner Abnahme der Zellzahl, woraus sich schließen läßt, daß dieser Anti-TNF- $\alpha$  nicht toxisch ist.

#### Tab.V.1:

<b>Auszutestende Lösungen</b>	<b>Gehalt an TNF a in mU/ml</b>
<u>Standardreihe</u>	
Medium + 50 U/ml	51.500 mU/ml
Medium + 5 U/ml	3.500 mU/ml
Medium + 0,5 U/ml	410 mU/ml
Medium + 0,05 U/ml	67 mU/ml
Medium + 0,005 U/ml	2 mU/ml
Medium R 10	0,3 mU/ml
<u>Testlösungen</u>	
Supernatant d0-d1	0,4 mU/ml
Supernatant d1-d2	0,2 mU/ml
Supernatant d2-d3	0,2 mU/ml
Supernatant d5-d6	0.3 mU/ml
Supernatant d10-d11	29 mU/ml
Supernatant d0-d3	0,7 mU/ml
Kultur mit 500 U/ml TNF- $\alpha$ d0-d3	260 mU/ml
Kultur mit 1000 U/ml TNF- $\alpha$ d0-d3	1.500 mU/ml
500 U TNF- $\alpha$ /ml + 5000 U anti-TNF $\alpha$ /ml	14 mU/ml

Legende: Für die Standardreihe wurde rekombinanter TNF- $\alpha$  von Dr. G.R .Adolf (Bender Wien) mit einer spezifischen Aktivität von  $2,6 \times 10^7$  U/mg verwendet. Man beachte, daß die Werte für die Kultursupernatanten den Wert für reines Kulturmedium R 10 nicht übersteigen. Der getestete Anti-TNF  $\alpha$  Antikörper war ein polyklonales Ig von Innogenetics, Bender, Wien. Es ist die Konzentration in neutralisierenden Einheiten angegeben.

## **5.)Diskussion:**

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß TNF- $\alpha$  im Überstand zumindest mit diesem Assay erst nach 10 Tagen nachweisbar wird. Die Ursache dafür kann entweder darin liegen, daß TNF- $\alpha$  auch vorher schon vorhanden ist, in äußerst geringen Mengen wirksam ist, und erst nach langer Zeit (10 Tage) der Produktionsmechanismus so weit angetrieben wurde, sodaß TNF- $\alpha$  erst jetzt nachweisbar wird; oder aber, TNF- $\alpha$  ist zu Beginn der Kultur tatsächlich nicht vorhanden und stellt dann ein Zeichen für den allgemeinen Zellzerfalls und Zelltodes, der nach ca. 8 Tagen beginnt, dar.

Sollte diese Annahme den Tatsachen entsprechen, daß TNF- $\alpha$  erst aufgrund des Zellzerfalls im Überstand erscheint, könnte dies ursächlich bedingt sein durch einen intrazellulären oder membranständigen TNF- $\alpha$ . Dieser erfüllt seine Aufgabe als Migrations-(mit)-stimulus in loco und erscheint erst nach dem Zellzerfall im Überstand.

Diese Möglichkeit würde auch die Unbeeinflussbarkeit des Migrationssystems der DZ in der Kultur durch Zugabe der Anti-TNF- $\alpha$  Antikörper erklären.

## VI. Sekretoneurin

### 1.) Einleitung:

Ein neues Neuropeptid, Sekretoneurin, wurde 1993 von der Arbeitsgruppe von Doz. R. Fischer-Colbrie am Institut für Pharmakologie der Universität Innsbruck entdeckt und beschrieben. Marksteiner und Mitarbeiter haben Sekretoneurin, welches aus dem Sekretogranin II durch proteolytisches Prozessing entsteht, im zentralen Nervensystem der Ratte mit Hilfe von Immunhistochemie und Radioimmunoassays genau lokalisiert [140]. Mit spezifischen Antisera wurden Fasern und Zellkörper im ganzen Zentralnervensystem sichtbar gemacht. Sekretoneurin wurde dabei in erster Linie in den C-Fasern lokalisiert. So erkannte man ein massives Vorkommen dieses Peptids in zahlreichen Gehirnstrukturen, wie z.B. im lateralen Septum, in der Amygdaloidea, im medialen Nucleus thalamicus, Substantia gelatinosa, Hypothalamus, Habenulae, Nucleus interperpendicularis usw. aber auch in einigen endokrinen Geweben. Hierbei stimmte die quantitative Verteilung, die durch Radioimmunoassays bestimmt wurde, gut mit den unterschiedlichen Ergebnissen aus der Immunzytochemie überein [135].

Über die Eigenschaften und Funktionen dieses Neuropeptids konnten bisher nur wenige Aussagen gemacht werden.

Capsaicin ist eine Substanz, die die Ausschüttung von Neuropeptiden aus den C-Fasern, und somit auch von Sekretoneurin initialisiert. Die Lokalisation in den C-Fasern läßt eine mögliche Rolle des Peptids bei der neurogen ausgelösten Entzündungsreaktion vermuten. Es war schon ein wichtiger Schritt, eine Akkumulation von Leukozyten als Entzündungsantwort auf Capsaicin zu verifizieren. Die Arbeitsgruppe Reinisch & Wiedermann [136] entdeckte, daß Sekretoneurin die selektive Migration von humanen Monozyten in vitro und in vivo triggert. Sie unternahmen mit gereinigten humanen Monozyten Chemotaxisstudien auf Nitrocellulose Micropore Filtern und beobachteten hier ihre Wanderung, wobei durch das Zufügen der Peptide Substanz-P oder Somatostatin die durch Sekretoneurin ausgelöste Migration der Monozyten noch weiter verstärkt werden konnte.

Schon seit einiger Zeit wird vermutet, daß Monozyten und dendritische Zellen im Blut eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen, also gleichen Ursprungs sind. Dies wurde kürzlich im Maussystem direkt demonstriert [147]. Hinsichtlich dieser Annahme bestünde somit auch die

Möglichkeit einiger gemeinsamer Eigenschaften. Aufgrund dieser Überlegung und basierend auf den Ergebnissen von Reinisch & Wiedermann untersuchte ich die Wirkung des Sekretoneurin auf dendritische Zellen im Allgemeinen, sowie auf die Migration der DZ in meinem Organkultursystem im Speziellen.

## **2.)Fragestellung:**

Es handelt sich hier um die ersten und bisher einzigen Untersuchungen über Sekretoneurin im Zusammenhang mit dendritischen Zellen. Deshalb wurden sehr basale Fragen gestellt.

1. Ist Sekretoneurin in der Epidermis und/oder Dermis der Maus vorhanden?
2. Ist Sekretoneurin ein Stimulus für die Migration der LZ in meinem Organkultursystem?  
Läßt sich die Migration der LZ mit Hilfe von Sekretoneurin beeinflussen, entweder in Form einer Blockierung oder einer Steigerung?
3. Hat Sekretoneurin eine Wirkung auf die Reifung der DZ sowie auf ihre Fähigkeiten zum Prozessieren und Präsentieren von Antigenen?

### **3.) Versuche/Ergebnisse:**

#### **3.1 Ist Sekretoneurin in der Epidermis oder Dermis vorhanden?**

Laut Protokoll wurden epidermale und dermale „sheets“ hergestellt und mit Hilfe eines Kaninchen-anti-Sekretoneurin-Antikörpers, der uns freundlicherweise von Doz. Dr. Rainer Fischer-Colbrie zur Verfügung gestellt wurde. Als Nachweisreagenzien wurden ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Ak (Amersham) gefolgt von Streptavidin-FITC verwendet. Als Kontrollen wurde ein Kaninchen Antikörper gegen humanen Faktor VIII (Dako) eingesetzt. Die Funktionsfähigkeit dieses Nachweissystems wurde an Kryostatschnitten von Humanhaut anhand einer anti-Faktor VIII Färbung (d.h. Gefäßfärbung) bestätigt.

Nachdem es sich hierbei nicht um einen gereinigten Antikörper handelt, sondern um ein Immun-Serum, und diese erfahrungsgemäß starken Background aufweisen, sind nur eindeutig positive Ergebnisse auswertbar.

Vor allem in den epidermalen, aber auch in den dermalen „sheets“ färbten sich lediglich vereinzelte, sehr stark positive „Punkte“, welche Sekretoneurin enthaltenden Granula entsprechen könnten. Derartige Strukturen färbten sich in den Kontrollen nicht an. Die Anzahl dieser Granula war jedoch äußerst gering. Sie waren wesentlich weniger dicht am „sheet“ verteilt, als es der Dichte von Langerhanszellen entsprechen würde. Somit waren epidermale und dermale Zellen in situ nicht mit Sicherheit als eindeutig positiv zu bewerten. In gleicher Weise wurden Zytozentrifugenpräparate von DZ gefärbt, die im „modifizierten“ Organkultursystem von d0-d1, d1-d2 und d2-d3 ausgewandert waren. Die Färbung mit Anti-Sekretoneurin war in keinem der Ansätze stärker als die Färbung mit dem Kontrollantikörper.

#### **3.2 Einfluß von Sekretoneurin auf das Organkultursystem**

Sekretoneurin wurde sowohl im klassischen als auch im modifizierten und im „getriggerten“ Organkultursystem getestet. Sekretoneurin erhielten wir von Dr. R. Fischer-Colbrie. Er empfahl eine Endkonzentration von  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  M. Diese Konzentration ergibt sich aus den Untersuchungen von Reinisch & Wiedermann [136]. Dabei führte eine Erhöhung der Sekretoneurin-Konzentration eher zu einer Verminderung der Wirksamkeit, also in ihrem Fall zu einer Verminderung der Monozytenchemotaxis. Deshalb verwendete ich in diesen „Screening-Experimenten“ keine höheren Konzentrationen.

**a) Das klassische System:**

In der klassischen Organkultur konnte keine Auswirkung des Sekretoneurin auf die Migration der LZ festgestellt werden.

Diese Aussage ist anhand der Ergebnisse aus verschiedenen, in Tab.VI.1 angeführten Experimenten zu entnehmen.

Tab.VI.1:

<b>Balb/c</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d3	27.300	9.900
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d3	29.400	12.100
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d3	32.100	11.600

<b>Balb/c</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d3	50.900	16.100
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d3	52.700	15.900

Legende: d0-d1, d1-d2, d2-d3: Dauer der Organkultur; Die Ohrhälften wurden täglich auf neues Medium transferiert.

Ges.: Gesamtzahl der im angegebenen Zeitraum ausgewanderten Zellen

DZ : Gesamtzahl der im angegebenen Zeitraum ausgewanderten dendritischen Zellen

**b) Das modifizierte System:**

Anhand der Ergebnisse (siehe Tab. VI.2) kann man ersehen, daß Sekretoneurin auch im modifizierten System keine Veränderung gegenüber der Inkubation mit reinem Medium erbringt. Die schon früher beobachtete und beschriebene Anreicherung der DZ im Verlauf der 3 Tage weitergezogenen Kultur ist auch hier in gleicher Weise vorhanden (Graphik VI.1).

Tab.VI.2:

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d1	23.400	7.200	<b>31</b>
		d1-d2	29.100	14.400	<b>49</b>
		d2-d3	18.500	11.300	<b>61</b>
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d1	38.100	11.700	<b>31</b>
		d1-d2	28.900	13.300	<b>46</b>
		d2-d3	23.500	13.900	<b>59</b>

<b>Balb/c</b>					
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>	<b>%DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d1	22.700	7.400	<b>33</b>
		d1-d2	20.400	9.700	<b>48</b>
		d2-d3	18.400	12.300	<b>67</b>
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d1	25.100	8.300	<b>33</b>
		d1-d2	22.900	10.800	<b>47</b>
		d2-d3	19.600	13.400	<b>68</b>

Legende: d0-d1, d1-d2, d2-d3: Dauer der Organkultur; Die Ohrhälften wurden täglich auf neues Medium transferiert.

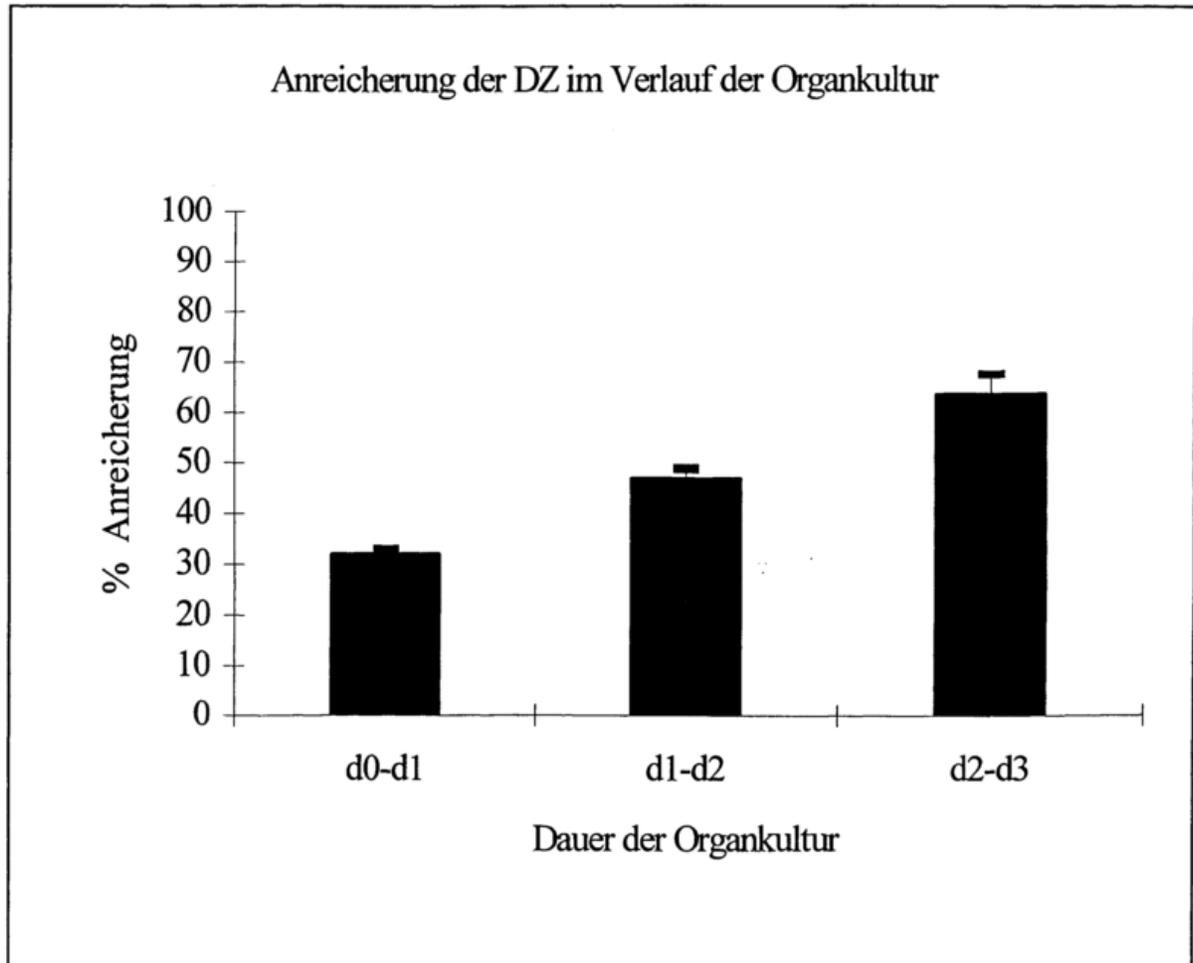
Ges.: Gesamtzahl der im angegebenen Zeitraum ausgewanderten Zellen

DZ : Gesamtzahl der im angegebenen Zeitraum ausgewanderten dendritischen Zellen

%DZ: Prozentueller Anteil der dendritischen Zellen an der Gesamtzellzahl

Graphik VI.1:

Darstellung der Anreicherung der DZ in der Organkultur mit Sekretoneurin



Legende: Die Säulen stellen Mittelwerte plus/minus Standardabweichung aus 3 unterschiedlichen Experimenten dar.

**c) Das „getriggerte“ System:**

Der Vollständigkeit halber testete ich auch Sekretoneurin im „getriggerten“, also fast abgestorbenen System. Wie schon im früheren Kapitel beschrieben, ist es möglich, die spontane Migrationsfähigkeit der DZ durch längeres Abliegen der Ohren im Kühlschrank vor Beginn der Organkultur zu bremsen bzw. durch Zugabe von Zytokinen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) wieder zu initialisieren (siehe Tab.VI.3).

Tab.VI.3:

<b>Balb/c Triggerzeit 25 h</b>				
		<b>Kultur- dauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d2	36.100	6.300
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d2	40.400	10.600
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	d0-d2	35.600	9.100
	GM-CSF 1000 U/ml	d0-d2	32.200	9.900

<b>Balb/c Triggerzeit 30 h</b>				
		<b>Kultur- dauer</b>	<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	40 h	20.400	5.200
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	40 h	36.100	10.000
	TNF- $\alpha$ 1000 U/ml	40 h	48.900	12.100
	GM-CSF 1000 U/ml	40 h	41.000	13.000

Legende: Triggerzeit: Zeit der Ablage der Ohren im Kühlschrank  
 Kulturdauer: Dauer der Inkubation auf Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>  
 Ges: Gesamtzahl der ausgewanderten Zellen  
 DZ: Anzahl der ausgewanderten dendritischen Zellen

Diese Zahlen demonstrieren, daß auch die Zugabe von Sekretoneurin die Migration der LZ wieder verstärkt. Vor allem der zweite Versuch, bei dem eine Erhöhung der Triggerzeit und eine Verkürzung der Inkubationszeit eine Verstärkung des Effekts bewirkte, demonstriert, daß die Zytokine eine stärkere Migration veranlaßten als das Neuropeptid Sekretoneurin.

**d) Das „geblockte“ System:**

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse versuchte ich, die Migration der DZ mit Hilfe des anti-Sekretoneurin-Antikörpers zu blocken. Dazu setzte ich den anti-Sekretoneurin-Antikörper in einer Konzentration von 1:100 und 1:1000 ein. Der Antikörper wurde dem Kulturmedium zugesetzt; er wurde nicht intradermal verabreicht. Die Ergebnisse dieses Ansatzes sind in Tabelle VI.4. aufgelistet. Daraus ist ersichtlich, daß es nicht möglich ist, die Migration der DZ mit dem anti-Sekretoneurin-Antikörper zu beeinflussen bzw. gar zu bremsen.

Tab.VI.4

<b>Balb/c</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 1	R10	d0-d2	20.100	8.400
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d2	24.000	7.700
	Anti-Sekretoneurin 1:100	d0-d2	23.500	7.200
	Anti-Sekretoneurin 1:1000	d0-d2	18.700	6.900

<b>Balb/c</b>				
			<b>Ges.</b>	<b>DZ</b>
Exp. 2	R10	d0-d2	27.300	9.400
	Sekretoneurin $10^{-6}$ M	d0-d2	31.400	10.000
	Anti-Sekretoneurin 1:100	d0-d2	30.400	8.700
	Anti-Sekretoneurin 1:1000	d0-d2	28.800	8.900

Legende: Ges: Gesamtzahl der ausgewanderten Zellen  
 DZ: Anzahl der ausgewanderten dendritischen Zellen  
 d0-d2: Dauer der Organkultur

### 3.3 Wirkung auf Reifung und Antigenpräsentation der DZ

In mehreren Experimenten testete ich, ob Sekretoneurin eine Wirkung auf die funktionellen Fähigkeiten der DZ zeigt. Ob die Fähigkeit zur Stimulation von ruhenden T-Zellen durch Sekretoneurin beeinflusst wird, wurde mit Hilfe einer Oxidativen Mitogenese (siehe Kap.II) ausgetestet. In einer ersten Reihe von Versuchen wurde untersucht, ob der Zusatz von Sekretoneurin zur Kokultur der ausgewanderten DZ mit den ruhenden T-Lymphozyten in der oxidativen Mitogenese einen Einfluß hat. Es wurden dabei also *reife* DZ verwendet, die im Verlauf von 3 Tagen aus Ohrhälfen von Balb/c-Mäusen in Abwesenheit von Sekretoneurin emigriert waren. In diesen Ansätzen läßt sich nicht auseinanderhalten, ob Sekretoneurin auf die DZ, die T-Zellen oder auf beide wirkt. Das Problem stellte sich jedoch nicht, da keine Wirkung des Sekretoneurins auf die oxidative Mitogenese beobachtet werden konnte (Tab.VI.5 und Graphik VI.2).

Frisch isolierte epidermale Langerhanszellen werden als *unreife* DZ betrachtet [1, 7, 34]. Sie können ruhende T-Zellen nur ungenügend oder gar nicht stimulieren. Zugabe von Sekretoneurin ( $10^{-6}$ ) zur oxidativen Mitogenese mit frischen LZ als stimulatoren führte ebenfalls zu keiner Erhöhung der immunstimulatorischen Kapazität,

Im Vergleich zu der früher angeführten oxidativen Mitogenese sind die Zahlen der Counts hier (Tab.VI.5) wesentlich höher. Dies liegt einerseits daran, daß hier frisch präparierte T-Zellen verwendet wurden, während im anderen Experiment (Tab.III.6) diese im flüssigem Stickstoff gelagert waren und aufgetaut wurden. Andererseits ist dies auch ein Hinweis darauf, daß bei funktionellen Versuchen jedes Experiment für sich betrachtet werden muß, in sich kontrolliert sein muß, und nur die Relationen verglichen werden können.

Um festzustellen, ob Sekretoneurin auf den Reifungsprozeß der DZ [1, 7, 34] einen Einfluß hat, wurde es während der Organkulturperiode zugegeben. Im vorigen Abschnitt wurde beschrieben, daß in dieser Versuchsanordnung das Sekretoneurin die Zahl der ausgewanderten DZ weder vermehrt noch vermindert. Die in Gegenwart von Sekretoneurin ausgewanderten DZ unterschieden sich morphologisch und im Hinblick auf ihre MHC-Klasse-II Expression nicht von DZ, die in reinem Kulturmedium emigriert waren. Auch in der MLR war die Fähigkeit zur Stimulation ruhender T-Zellen nicht verändert (Tab.VI.6). Sekretoneurin scheint also den Reifungsprozeß der DZ nicht merklich zu beeinflussen.

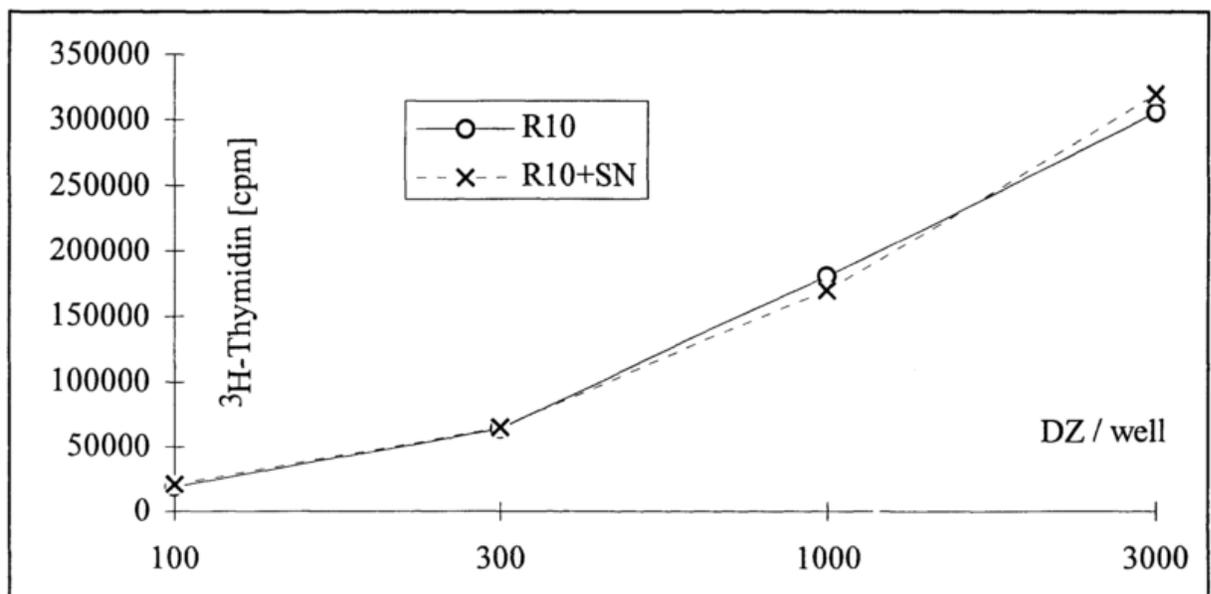
Tab.VI.5:

Oxidative Mitogenese				
Zusatz zur oxidativen Mitogenese	Höchstdosis			
	3.000 DZ/well	1.000 DZ/well	300 DZ/well	100 DZ/well
kein Zusatz	306.500	180.000	63.400	12.900
SN $10^{-6}$ M	320.700	169.000	64.300	21.100
SN $10^{-7}$ M	297.000	162.400	68.100	20.800

Legende: Die 3 Tage lang in der Organkultur ausgewanderten DZ aus Ohrhälften von Balb/c Mäusen wurden mittels Dichtentrennung auf bovinen Serumalbuminsäulen auf ca. 60-70% angereichert und in verschiedenen Dosen mit 300.000 T-Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit von Sekretoneurin  $10^{-6}$  M bzw.  $10^{-7}$  M 24 h inkubiert. Zur Messung der Proliferation wurde  $[^3\text{H}]$ -Thymidin zugesetzt und dessen Inkorporation nach weiteren 14 h gemessen. Die angegebenen Zahlen stellen counts per minute (cpm) dar. In allen Ansätzen ohne DZ kam es nur zu minimaler Proliferation der T-Zellen: T-Zellen alleine, 1000 cpm; T-Zellen alleine + SN  $10^{-6}$  M, 1000 cpm; + SN  $10^{-7}$  M, 800cpm.

Graphik VI.2:

Graphische Darstellung der Proliferationsstimulation mit und ohne Sekretoneurin in der OXMI



Legende: Hier wurden nur die Werte aus der normalen OXMI bzw OXMI + SN  $10^{-6}$  dargestellt

Tab.VI.6.:

<b>Xeno-MLR</b>				
<b>Art der Zellen</b>	<b>Höchstdosis</b>			
	<b>10.000 DZ/well</b>	<b>3.000 DZ/well</b>	<b>1.000 DZ/well</b>	<b>300 DZ/well</b>
<b>DZ in R 10 d0-d3</b>	46.800	31.600	9.200	3.900
<b>DZ in SN 10<sup>-6</sup> M d0-d3</b>	58.600	19.700	7.100	3.100
<b>DZ in R 10 d2-d3</b>	38.500	18.900	10.000	5.100
<b>DZ in SN 10<sup>-6</sup> M d2-d3</b>	42.000	16.400	8.600	4.900

Legende: In dieser xenogenen MLR wurden DZ, die in reinem Medium ausgewandert sind, mit DZ, die in SN 10<sup>-6</sup> M ausgewandert sind in ihrer stimulatorischen Aktivität verglichen. Dabei stimulierten ausgewanderte murine reife kutane DZ (d0-d3 und d2-d3) humane T-Lymphozyten (200.000 hu T-Zellen/well). Zur Messung der Aktivität wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt und dessen Inkorporation in counts per minute (cpm) nach 5d gemessen. Im Ansatz ohne DZ kam es zu minimaler Proliferation der T-Zellen (600cpm).

Im weiteren wurde auch untersucht, ob Sekretoneurin die Fähigkeit zur Prozessierung von Antigenen in irgendeiner Weise beeinflusst und auf diese Weise in den Reifungsprozeß eingreift. Dazu wurden epidermale Langerhanszellen (LZ) verwendet, für die wiederholt gezeigt wurde, daß sie im frisch isolierten, unreifen Zustand native Proteinantigene sehr wirkungsvoll in immunogene MHC-Peptid-Komplexe „prozessieren“ können, und daß sie diese Fähigkeit während der 3d Kultur (d.h.Reifung) weitgehend verlieren [7, 47, 49]. Doch auch hier kommt es zu keiner Beeinflussung der DZ (Siehe Tab.VI.7). Sekretoneurin führte weder dazu, daß das Prozessierungsvermögen von frischen LZ gehemmt wird, noch, daß es in kultivierten LZ wieder angekurbelt wird. Zusätzlich zu den in Tab.VI.7 angeführten Daten kam ich zu gleichen Befunden mit den Hybridomen 11.3.7 (spezifisch für Myoglobin) und 3DO-54.8 (spezifisch für Ovalbumin). Es kann also letztendlich angenommen werden, daß Sekretoneurin in keiner Weise die DZ beeinflusst und somit sehr selektiv auf die Migration und Chemotaxis der Monozyten wirkt.

Tab.VI.7:

Messung der Fähigkeit zur Prozessierung von Antigenen mit dem Antigen HEL und dem antigenspezifischen T-Zell-Hybridom Hd-1.ACs

Art der Stimulatorzellen	Höchstdosis 10.000 DZ/well	3.000 DZ/well	1.000 DZ/well	300 DZ/well	100 DZ/well	30 DZ/well
Frisch isolierte LZ	65.900	61.700	52.700	45.200	32.400	7.000
Frisch isolierte LZ + SN 10 <sup>-6</sup> M	58.800	57.800	50.000	40.300	23.100	7.600
Kultivierte LZ..d3	2.500	2.600	2.800	3.200	2.900	2.100
Kultivierte LZ d3 + SN <sup>-6</sup> M	2.700	2.700	2.600	2.700	2.300	1.800

Legende: Frisch isolierte und mittels anti-Thy-1 und Komplement-Behandlung auf 10% angereicherte epidermale LZ sowie 3d kultivierte und mittels Dichtentrennung auf bovines Serum-Albumin-Säulen auf ca. 60-70% angereicherte LZ von Balb/c-Mäusen wurden in verschiedenen Dosen mit 50.000 Hybridomzellen in Gegenwart oder Abwesenheit des nativen Antigens inkubiert. Als Antigen wurde Lysozym aus dem Hühnerei (HEL, hen egg lysozyme) in einer Endkonzentration von 6,8µM entsprechend 100µg/ml eingesetzt. Nach 24 h wurde der IL-2 Gehalt in den Überständen mittels des CTLL-Bioassays bestimmt. Background-Proliferation war 1.700 cpm. In allen Ansätzen ohne Antigen kam es zu keiner IL-2 Sekretion des Hybridoms; diese Werte sind nicht angeführt. Die kultivierten LZ waren viabel und intakt, da sie in einer parallel angesetzten oxidativen Mitogenese starke T-Zell Proliferation induzierten.

#### **4.)Diskussion:**

Offensichtlich hat Sekretoneurin keinen erkennbaren, spezifischen Einfluß auf Entwicklung, Reifung, Antigenpräsentation oder Migration der DZ. Die immunhistochemische Auswertung an den epidermalen „sheets“ ist nicht als eindeutig positiv zu bewerten. Wenn überhaupt, so sind sicher nur sehr geringe Mengen von Sekretoneurin in dendritischen Zellen der Epidermis und Dermis. Das würde allerdings nicht prinzipiell gegen eine Funktion von Sekretoneurin in der Haut sprechen. Das Neuropeptid kann in geringsten Mengen, die immunhistochemisch nicht mehr erfaßbar sind, biologisch aktiv sein.

Einzig die Stimulation der Auswanderung im „getriggerten“ Organkultursystem läßt auf einen Zusammenhang zwischen Sekretoneurin und DZ schließen. Dort führte die Zugabe von Sekretoneurin, aber in gleicher Weise auch von TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  und GM-CSF zu einer Rekonstitution der DZ-Wanderung. Theoretisch kann jedoch Sekretoneurin auch zur Induktion indirekter Mechanismen (z.B.in Keratinozyten) beitragen, welche die Zytokinkaskade, und somit die Migration der DZ wieder in Gang setzen. Weiterführende Experimente, bei denen die Zugabe von Sekretoneurin mit blockierenden Antikörper gegen die anderen Zytokine kombiniert wird, können mehr Aufschluß geben. Ebenso wichtig wird es sein, die Zytokinproduktionsmuster von Keratinozyten in Abhängigkeit von Sekretoneurin zu studieren. Die Untersuchungen mit dem Anti-Sekretoneurin-Antikörper in der Organkultur lassen auch hier (wie auch schon früher erwähnt) die Möglichkeit offen, daß dieser Antikörper nicht an seinen Wirkort gelangen konnte. Ein Probeversuch, bei dem ich Ohrhälften auf ein 1:1 Kulturmedium-B21/2-Gemisch auflegte, ergab nach Färbung mit nur dem zweiten Antikörper und Streptavidin-FITC das Ergebnis, daß höhermolekulare Substanzen (wie z.B. der Antikörper B21/2) sehr wohl eindringen können. Trotzdem kann dieses Eindringen durch Diffusion eventuell zu langsam sein, um eine Wirkung in Form von Blockierung des Systems zu erreichen. Vielleicht kann das in Kapitel IV Abschnitt 3.3 beschriebene kombinierte in vivo-in vitro Modell zusätzliche Aufschlüsse geben.

Die Ergebnisse aus den funktionellen Untersuchungen (OXMI, MLR, Antigenprozessierungsassay) weisen darauf hin, daß Sekretoneurin keinen Einfluß auf die Reifung und Funktion der DZ hat. Aufgrund dieser Daten kann aber eine Rolle des Sekretoneurins bei der Reifung von DZ nicht völlig ausgeschlossen werden. In den hier geschilderten Ansätzen wurde das Neuropeptid immer zu Kulturen zugegeben, die aus verschiedenen Zelltypen bestanden; epidermale und dermale Zellen in der Organkultur; Keratinozyten und Langerhanszellen bei der Kultur von durch Trypsinisierung hergestellten Epidermalzellsuspensionen. In beiden Fällen reifen die DZ in einem Milieu, das reich an Zytokinen ist und wo ein vielleicht

möglicher Einfluß des Sekretoneurins nicht zum tragen kommt. Es wäre denkbar, daß die Zugabe von Sekretoneurin oder Anti-Sekretoneurin zur Kultur von hochreinen Populationen von frisch isolierten Langerhanszellen, allein oder in Kombination mit GM-CSF und/oder TNF- $\alpha$  [43, 44], Effekte des Neuropeptids aufzeigen kann.

Abschließend kann also festgestellt werden, daß Sekretoneurin in dieser Form der Organkultur sowie auch in den funktionellen Tests keine Modifikation der DZ verursachte, somit also mit großer Wahrscheinlichkeit keine massive Wirkung auf diesen Zweig des Immunsystems hat. Mögliche subtilere, modulierende Effekte müssen in weiteren Studien untersucht werden. Rezente Daten, die eine hemmende Wirkung des Neuropeptids CGRP (calcitonin-gene-related-peptide) auf LZ-induzierte Immunantworten *in vitro* gezeigt haben [141], unterstreichen die Bedeutung solcher molekularer Interaktionen zwischen Nervensystem und Immunsystem.

## VII. ZUSAMENFASSUNG

**Hintergrund.** Dendritische Zellen (DZ) sind hochspezialisiert zur Einleitung primärer Immunantworten im Organismus. In der hochgradigen Ausprägung dieser Eigenschaft unterscheiden sie sich von anderen Arten von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen oder B Lymphozyten. Zellzüchtungsexperimente und Zytokinrezeptoranalysen zeigen, daß DZ ein eigenständiges Zellsystem darstellen, welches sich distinkt von den mononukleären Phagozyten unterscheidet, aber mit diesen Zellen, sowie den Granulozyten eine gemeinsame, myeloide Progenitorzelle teilt. DZ erfüllen ihre Funktion in vivo in drei zeitlich voneinander abgegrenzten Abschnitten. (1) *Überwachungsfunktion:* In vielen nicht lymphatischen Geweben liegen DZ in einem *unreifen* Zustand vor (Gewebs-DZ), in dem sie native Proteinantigene sehr effizient in immunogene Peptid/MHC Komplexe prozessieren können. (2) *Migrationsfunktion:* Mit diesen Komplexen beladen, wandern die DZ zu den regionären lymphatischen Organen. (3) *Adjuvansfunktion:* Dort angelangt haben sie sich zu *reifen* DZ (lymphoiden DZ) umgewandelt, die große Mengen an MHC-, Adhäsions-, und kostimulatorischen Molekülen exprimieren und ruhende T Lymphozyten wirkungsvoll mit den Peptid/MHC Komplexen, die sie in den nicht-lymphatischen Geweben generiert haben, aktivieren können. Dieses Konzept wurde in erster Linie anhand von Langerhanszellen (LZ), den DZ der Epidermis, erarbeitet.

**Fragestellung/Methodik.** Diese Dissertation stellt eine Studie zur Wanderungsfunktion von DZ im Maussystem dar. Dazu wurde ein Organkultursystem für murine Haut (Ohrhälften) adaptiert und verbessert und damit Fragen zum Mechanismus der Migration gestellt. Primär interessierte, welches Zytokin oder welche Kombination aus Zytokinen die Emigration der kutanen DZ auslöst. Zellulär-immunologische und immunhistochemische Methoden wurden eingesetzt. Im Prinzip wurde versucht, die Migration der DZ in der Organkultur durch Zugabe von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF) zu fördern bzw. durch Zugabe von Anti-Zytokin/Zytokinrezeptor Reagenzien (neutralisierende Antikörper, IL-1 Rezeptor-Antagonist, löslicher TNF-Rezeptor) zu hemmen.

**Ergebnisse.** Morphologische, immunhistochemische und funktionelle Analysen der kultivierten Haut (Epidermis und Dermis), sowie der während der Kultur ins Kulturmedium ausgewanderten Zellen zeigten, daß (1) die kutanen DZ 2-3 Tage benötigen, um völlig gereift zu sein (oxidative Mitogenese, Expression des Reifungsmarkers 2A1); daß (2) die strangförmigen dermalen Ansammlungen ("cords") von in den "cords" befindlichen DZ

typische Reifungsmarker (mAk 2A1) exprimiere, (3) die Auswanderungsrate der DZ und deren funktionelle Eigenschaften (Prozessierfähigkeit für native Proteinantigene und Stimulationsfähigkeit für ruhende T Lymphozyten) durch Zugabe des Neuropeptids *Sekretoneurin* nicht verändert wurden.

Die Experimente zum Mechanismus der Migration zeigten, daß (1) die Zugabe von Zytokinen zur Organkultur keine Wirkung hat, daß aber (2) in einem veränderten Organkultursystem, wo die endogene Zytokinproduktion der Zellen im kultivierten Hautstück vermindert ist, mit allen getesteten Zytokinen eine Steigerung der Auswanderung zu erzielen war. (3) In einer Kombination aus intradermaler Verabreichung der Zytokine und anschließender Organkultur erwies sich *IL-1 $\beta$*  als fördernd für die Auswanderung. (4) Mit Ausnahme eines *anti-IL-1 $\beta$*  Antikörpers konnte keines der anti-Zytokin Reagenzien die Migration der DZ aus der Haut ins Kulturmedium hemmen. (5) Die immunhistochemische Untersuchung der Epidermis nach intradermaler Zytokininjektion zeigte eine Abnahme der LZ in situ nach *IL-1 $\beta$*  und *TNF- $\alpha$* , obwohl bei letzterem Zytokin keine Zunahme der ins Medium ausgewanderten DZ festzustellen war.

**Schlußfolgerungen.** Durch die experimentellen Manipulationen (Abschneiden der Ohren) zur Herstellung der Organkultur wird ein Migrationsstimulus gesetzt, der durch exogene Zugabe von Zytokinen nicht mehr verändert werden kann. Ebenso schwer kann dieser initiale Stimulus durch im Nachhinein der Kultur zugefügte blockierende Reagenzien beeinflusst werden. Zwei experimentelle Wege werden hier aufgezeigt, wie dieses Problem vermindert werden kann. Erstens kann durch eine 20-40 stündige Lagerungsperiode vor dem Ansetzen der Organkultur der initiale Stimulus abklingen und Zytokinzugabe zeigt daher Wirkung. Zweitens kann durch intradermale Applikation und anschließende Organkultur die Wirkung der Reagenzien verbessert werden. Weiters kann aus den Daten dieser Arbeit geschlossen werden, daß *IL-1 $\beta$*  und wahrscheinlich auch *TNF- $\alpha$*  entscheidende Zytokine im Mechanismus der DZ Migration sind.

## VII. Literaturverzeichnis

1. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271
2. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142
3. Schuler G, Romani N, Stössel H, Wolff K (1991) Structural organization and biological properties of epidermal Langerhans cells. In *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans Cells. CRC Press, Boca Raton*, pp 87-137
4. Steinman RM, Schuler G, Romani N and Kaplan G (1988) Dendritic Cells. *Book: Atlas of Blood Cells - Function and Pathology, Vol.1* p:361
5. Romani N, Schuler G, Fritsch P (1991) Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans Cells. CRC Press, Boca Raton*, pp 49-86
6. Stingl G, Shevach EM (1991) Langerhans cells as antigen presenting cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans Cells. CRC Press, Boca Raton*, pp 159-190
7. Romani N, Witmer-Pack M, Crowley M, Koide S, Schuler G, Inaba K, Steinman RM (1991) Langerhans cells as immature dendritic cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton*, pp 191-216
8. Witmer-Pack MD, Steinman RM (1984) The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light microscopic, immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch. *Am J Anat.* 170: 465
9. Agger R, Witmer-Pack MD, Romani N, Stössel H, Swiggard WJ, Metlay JP et al (1992) Two populations of splenic dendritic cells detected with M342, a new monoclonal to an intracellular antigen of interdigitating dendritic cells and some B lymphocytes. *J Leukocyte Biol* 52: 34
10. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G (1986) Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163: 981
11. Wolff K (1991) The fascinating story that began in 1868. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans Cells. CRC Press, Boca Raton*, pp 1-21
12. Germain RN (1991) Antigen presentation . The second class story. *Nature* 353: 605
13. Freudenthal PS, Steinman RM (1990) The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Sci. USA* 87: 7698
14. Young JW, Steinman RM (1988) Accessory cell requirements for the mixed leukocyte reaction and polyclonal mitogens, as studied with a new technique for enriched blood dendritic cells. *Cell. Immunol.* 111: 167
15. Bujdoso R, Hopkins J, Dutia BM, Young P, McConnell (1989) Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J. Exp Med.* 170: 1285

16. Pugh CW, MacPherson GG, Steer HW (1983) Characterisation of non-lymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 157: 1758
17. Knight SC (1984) Veiled cells - „dendritic cells“ of the peripheral lymph. *Immunobiology* 168: 349
18. Pollard AM, Lipscomb MF (1990) Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J Exp Med* 172: 159
19. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG (1991) Studies of the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airway. *J Exp Med* 173: 1345
20. Faustmann D, Steinman RM, Gebel H, Hauptfeld V, Davie J and Lacy P (1984) Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3864
21. Breathnach SM (1991) Origin, cell lineage, ontogeny, tissue distribution, and kinetics of Langerhans cells. In: *Schuler G (ed) Epidermal Langerhans Cells CRC Press, Boca Raton, pp 23-47*
22. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N (1993) Human and murine dermis contain dendritic cells. *J Clin Invest* 92: 2587
23. Wiedmann A (1964) Über die Struktur des neurovegetativen Systems. *Hautarzt* 15: 13
24. Birbeck MS, Breathnach AS and Everall JD (1961) An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cell) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51
25. Katz SI, Tamaki K and Sachs DH (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282: 324
26. Frelinger JG, Hood L, Hill S and Frelinger JA (1979) Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282: 321
27. Köhler G and Milstein C (1975) Continued cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495
28. Wolff K (1972) The Langerhans cell. *Curr Probl Dermatol* 4: 79
29. Stingl G, Katz SI, Clements L, Green I, Shevach EM (1978) Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005
30. Silberberg IR, Baer R, Rosenthal SA (1976) The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol* 66: 210
31. Thorbecke GJ, Silberberg-Sinakin I and Flotte TJ (1980) Langerhans cells as macrophages in skin and lymphoid organs. *J Invest Dermatol* 75: 32
32. Wolff K and Schreiner E (1970) Uptake, intracellular transport and degradation of exogenous protein by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 54: 37-52^
33. Witmer-Pack MD, Valinsky J, Olivier W and Steinman RM (1988) Quantitation of surface antigens on cultured murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J Invest Dermatol* 90: 387

34. Schuler G, Steinman RM (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161: 526
35. Romani N, Lenz A, Glassl H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G (1989) Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93: 600
36. Teunissen MBM, Wormmeester J, Krieg SR, Peters PJ, Vogels IMC, Kapsenberg ML, Bos JD (1990) Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphological changes during in vitro culture. *J Invest Dermatol* 94: 166
37. Tang A, Udey MC (1991) Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low-dose ultraviolet B radiation. Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD45) expression by murine Langerhans cells. *J Immunol* 146: 3347
38. Symington FW, Brady W and Linsley PS (1993) Expression and function of B7/BB1 on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 150: 1286
39. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS and Lowry RP (1992) Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 176: 1215
40. Young JW, Koulova L, Soegel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B (1992) The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 90: 229
41. Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinsky J, Atassi B, Steinman RM, (1986) The immunologic properties of purified Langerhans cells: distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med* 164: 605
42. Inaba K, Romani N, Steinman RM (1989) An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell proliferative response to dendritic cells. *J Exp Med* 170: 527
43. Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G and Steinman RM (1987) Granulocyte/macrophage colony stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 166: 1484
44. Heufler C, Koch F and Schuler G (1988) Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 172: 1471
45. Stössel H, Koch F, Kämpgen E, Stöger P, Lenz A, Heufler C, Romani N and Schuler G (1990) Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 172: 1471
46. Kämpgen E, Koch F, Stöger P, Heufler C, Schuler G and Romani N (1991) Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: Synthesis, sialylation of invariant chain and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad USA* 88: 3014

47. Puré E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G and Steinman RM (1990) Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med* 172: 1459
48. Becker D, Reske-Kunz AB, Knop J and Reske (1991) Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized and expressed by mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol* 21: 1213
49. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K and Steinman RM (1989) Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169: 1169
50. Romani N and Schuler G (1992) The immunogenetic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin Immunopathol* 13: 265
51. Romani N and Schuler G (1989) Structural and functional relationship between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Res Immunol* 140: 895
52. Steinman RM, and Inaba K (1989) Immunogenicity: role of dendritic cells. *BioEssays* 10: 145
53. Kämpgen E, Koch f, Heufler C, Eggert A, Gill LL, Gillis S, Dower SK, Romani N and Schuler G (1994) Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp Med* 179: (in Druck/Juni 1994)
54. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT and Steinman RM (1990) Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen specific, MHC restricted T cells in situ. *J Exp Med* 172: 631
55. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P, Steinman RM and Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: (in Druck/Juli 1994)
56. Inaba K, Inaba N, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S et al (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693
57. Brodsky FM and Guagliardi LE (1991) The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 9: 707
58. Neefjes JJ and Momburg F (1993) Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 5: 27
59. Aiba S, Katz SJ (1990) Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cells. *J Immunol* 145: 2791
60. Crowley M, Inaba K and Steinman RM (1990) Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med* 172: 383
61. Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P (1987) Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med* 166: 1654

62. Hauser C (1990) Cultured epidermal Langerhans cells activate effector cells for contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 95: 436
63. Hauser C and Katz SI (1988) Activation and expansion of hapten- and protein-specific T helper cells from nonsensitized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5625
64. Toews GB, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein JW (1980) Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124: 445
65. Streilein JW (1989) Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J Invest Dermatol* 93: 443
66. Tse Y, Cooper KD (1990) Cutaneous dermal Ia<sup>+</sup> cells are capable of initiating delayed-type hypersensitivity responses. *J Invest Dermatol* 94:267
67. Romagnoli P, Labhardt AM and Sinigaglia F (1991) Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J* 10: 1303
68. Kolde G and Knop J (1987) Different cellular reaction patterns of epidermal Langerhans cells after application of contact sensitizing, toxic and tolergenic compounds. A comparative ultrastructural and morphometric time-course analysis. *J Invest Dermatol* 89: 19
69. Grabbe S, Bruvers S, Gallo RL, Knisely TL, Nazareno R and Granstein RD (1991) Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 146: 3656
70. Grabbe S, Bruvers S, Lindgren AM, Hosoi J, Tan KC and Granstein RD (1992) Tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells in the mouse: Modulation by granulocyte-macrophage colony stimulating factor, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and ultraviolet radiation. *J Leukocyte Biol* 52: 209
71. Steinman RM, Nogueira N, Witmer MD, Tydings JD and Mellman IS (1980) Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigen on cultured mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 152: 1248
72. Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW and Vitetta ES (1984) Increased expression of Ia antigen on resting B cells: An additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6149
73. Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, Paul WE and Meltzer MS (1987) B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J Immunol* 139: 135
74. Pessara U, Momburg F and Koch N (1988) Cooperative effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the induction of class II antigen associated invariant chain expression. *Eur J Immunol* 18: 1719
75. Koch F, Kämpgen E, Trockenbacher B, Heufler C, Stöger P, Romani N and Schuler G (1992) Tumor necrosis factor alpha induces loss of immunogenic peptides from MHC class II molecules and thus interrupts the antigen presenting function of epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 89: 510 (abstract)

76. Koch F, Heufler C, Kämpgen E, Schneeweis D, Böck G and Schuler G (1990) Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture but in contrast to granulocyte/macrophage colony stimulating factor without inducing their functional maturation. *J Exp Med* 171: 15
77. Baker CF, Billingham RE (1968) The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J Exp Med* 128: 197
78. Frey JR, Wenk P (1957) Experimental studies on the pathogenesis of contact eczema in the guinea pig. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 11: 81
79. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM (1990) Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 171: 307
80. Bergstresser PR, Toews GB, Streilein JW (1980) Natural and perturbed distribution of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting and dinitrofluorobenzene sensitization. *J Invest Dermatol* 75: 73
81. Weinlich G, Sepp N, Koch F, Schuler G, Romani N (1990) Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogens/nonsensitizers (abstract). *Arch Dermatol Res* 281: 556
82. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM (1990) Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172: 1483
83. Okamoto H, Kripke ML (1987) Effector and suppressor circuits of the immune response are activated in vivo by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3841
84. Hill S, Edwards AJ, Kimber I and Knight SC (1990) Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization. *J Immunol* 145: 277
85. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang J-M, Bucana C, (1990) Evidence that cutaneous antigen presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 145: 1833
86. Aiba S, Nakagawa S, Ozawa H, Miyake K, Yagita H and Tagami H (1993) Upregulation of alpha-4 integrin on activated Langerhans cells: Analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to the migration from skin to draining lymph nodes. *J Invest Dermatol* 100: 143
87. Sterry W, Künne N, Weber-Matthiesen K, Brasch J and Mielke V (1991) Cell trafficking in positive and negative patch-test reactions: Demonstration of a stereotypic migration pathway. *J Invest Dermatol* 96: 459
88. Norris P, Poston RN, Thomas DS, Thornhill M, Hawk J and Haskard DO (1991) The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: A comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 96: 763
89. Goebler M, Gutwald J, Roth J, Meinardus-Hager G and Sorg C (1990) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine allergic contact dermatitis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93: 294
90. Tang A, Ammagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC, (1993) Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82

91. Vermeer M and Streilein JW (1990) Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7: 258
92. Cumberbatch M and Kimber I (1992) Dermal tumor necrosis factor alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology* 75: 257
93. Cumberbatch M, Fielding I and Kimber I (1994) Modulation of epidermal Langerhans cell frequency by tumor necrosis factor alpha. *Immunol* 81: 395
94. Romani N, Schuler G, Heufler C, Koch F, Topar G and Kämpgen E (1993) Langerhans cells and cytokines. In: *Epidermal growth factors and cytokines ; Luger TA and Schwarz T* editors. Manuel Dekker, New York, pp:345
95. Enk AH and Katz SI (1992) Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1398
96. Inaba K and Steinman RM (1986) Accessory cell- T lymphocyte interactions: antigen dependent and independent clustering. *J Exp Med* 164: 605
97. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong S-C, Barlow A, Janeway CA Jr (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353: 622
98. Romani N, Inaba K, Witmer-Pack M, Crowley M, Puré E, Steinman RM (1989) A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphocytes. *J Exp Med* 169: 1153
99. Demotz S, Grey HM, Sette A (1990) The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249: 1028
100. Steinman RM and Young JW (1991) Signals arising from antigen-presenting cells. *Current Opinion in Immunology* 3: 361
101. Mueller DL, Jenkins MK and Schwartz RH (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann Rev Immunol* 7: 445
102. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS and Thompson CP (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11: 211
103. Koulova L, Clark EA, Shu G and Dupont B (1991) The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 173: 759
104. Reiser H, Freeman GJ, Razi-Wolf Z, Gimmi CD, Benacerraf B and Nadler LM (1992) Murine B7 antigen provides an efficient costimulatory signal for activation of murine T lymphocytes via the T cell receptor /CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 271
105. Romani N, Kämpgen E, Koch F, Heufler C and Schuler G (1990) Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines . *Int Rev Immunol* 6: 151
106. Steinman RM (1988) Cytokines amplify the function of accessory cells. *Immunol Lett* 17: 197

107. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ and Butcher EC (1991) The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1. *J Exp Med* 174: 1461
108. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA and Butcher EC (1991) ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349: 796
109. Shimizu Y, Shaw S, Graber N, Gopal TV, Horgan KJ, Van Seventer GA and Newman W (1991) Activation independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature* 349: 799
110. Krutmann J, Trefzer U, (1992) Modulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human keratinocytes by ultraviolet (UV) radiation. *Springer Semin Immunopathol* 13: 333
111. Inaba K and Steinman RM, (1984) Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* 160: 1717
112. Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD (1990) The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. *Int Rev Immunol* 6: 89
113. Azato K, Mayer N, Sachs DH (1980) Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigen. *J Immunol* 124: 533
114. Hume DA, Robinson AP, Mac Pherson GG, Gordon S (1993) The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med* 158: 1522
115. Austyn JM and Gordon S (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophages. *Eur J Immunol* 11: 805
116. Nussenzweig MC, Steinman RM (1980) Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* 151: 1196
117. Kuhlmann P, Moy VT, Lollo BA, Brian AA (1991) The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation : Contribution of adhesion and coactivation. *J Immunol* 146: 1773
118. Germain RN, Margulies DH (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presenting. *Annu Rev Immunol* 11:403
119. Jenkinson E, Franchi L, Kingstone R and Owen J (1982) Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment in vitro: application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur J Immunol* 12: 583
120. Heine M, Koch F, Weinlich G, Schuler G and Romani N (1994) Murine Langerhans cells migrate into dermal lymphatics upon culture as a model to study the induction phase of cutaneous immune responses. *Arch Dermatol Res* 285: 172 (abstract)

- 121.Gravenstein LA, Blom B, Nolten LA, de Vries E, Van der Horst G, Ossendorp F et al (1993) Cloning and expression of murine CD27: Comparison with 4 - 1BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor family. *Eur. J Immunol* 23: 943
- 122.Cruz PD, Bergstresser PR (1991) The influence of ultraviolet radiation and other physical and chemical agents on epidermal Langerhans cells. In: *Epidermal Langerhans cells ; Schuler G editor, CRC Press, Inc, Boca Raton, pp: 253-271*
- 123.Austyn JM (1989) Migration patterns of dendritic leukocytes. *Res Immunol* 140: 898
- 124.Austyn JM, Larsen CP (1990) Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 49: 1
- 125.Elmets CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW (1983) Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med* 158: 781
- 126.Rae V, Yoshikawa T, Streilein JW, Taylor JR (1989) Unresponsiveness induced in man by DNCB painted on UVB-treated skin. *J Invest Dermatol* 92: 503
- 127.Yoshikawa T, Rae V, Bruins-Slot W, Van den Berg JW, Taylor JR et al. (1990) Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J Invest Dermatol* 95: 530
- 128.Luger TA, Schwarz T (1991) Epidermal cell derived secretory regulins. Schuler G editor: *Epidermal Langerhans Cells pp: 217*
- 129.Heufler C, Topar G, Koch F, Trockenbacher B, Kämpgen E, Romani N, Schuler G (1992) Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspension: Interleukin 1 $\beta$  and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J Exp Med* 176: 1221
- 130.Matsue H, Cruz PD Jr, Bergstresser PR, Takashima A (1992) Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1 $\beta$  and MIP-1 $\alpha$  among unstimulated mouse epidermal cells. *J Invest Dermatol* 99: 537
- 131.Enk AH, Angeloni VL, Udey MC and Katz SI (1993) An essential role for Langerhans cell derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol* 150: 3698
- 132.Nylander Lundqvist E, Bäck O (1990) Interleukin -1 decreases the number of Ia<sup>+</sup> epidermal dendritic cells but increases their expression of ia antigen. *Acta Derm Venerol* 70: 391
- 133.Romani N, Kämpgen E, Koch F, Heufler C and Schuler G (1990) Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines. *Int Rev Immunol* 6: 151
- 134.Mac Neil D, Fraga E, Singh B (1992) Inhibition of superantigen recognition by peptides of the T cell receptor  $\beta$  chain. *Eur J Immunol* 22: 937
- 135.Marksteiner J, Kirchmair R, Mahata SK, Mahata M, Fischer-Colbrie R, Hogue-Angeletti R, Saria A and Winkler H (1993) Distribution of secretoneurin, a peptide derived from secretogranin II, in rat brain: An immunocytochemical and radioimmunological study. *Neuroscience* 54: 923

- 136.Reinisch N, Kirchmair R, Kähler CM, Hogue-Angeletti R, Fischer-Colbrie R, Winkler H and Wiedermann CJ (1993) Attraction of human monocytes by the neuropeptide secretoneurin. *FEBS Lett* 334: 41
- 137.Moodycliffe AM, Kimber I and Norval M (1992) The effect of ultraviolet B irradiation and urocanic acid isomers on dendritic cell migration. *Immunol* 77: 394
- 138.Yoshikawa T, Kurimoto I and Streilein W (1992) Tumor necrosis factor alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunol* 76: 264
- 139.Morhenn VB, Lee SW, Ilnicka M and Eugui EM (1992) Activated human Langerhans cells express mRNA for IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and produce these cytokines but do not secrete them. *Cytokine Nov* 4 (6): 500
- 140.Kirchmair R, Hogue-Angeletti R, Gutierrez J, Fischer-Colbrie R and Winkler H (1993) Sekretoneurin-A neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of Sekretogranin II ( Chromogranin C). *Neuroscience* 53: 359
- 141.Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A and Granstein RD (1993) Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature Vol* 363: 159
- 142.Schreiber S, Kilgus O, Payer E, Kutil R, Elbe A, Mueller C and Stingl G (1992) Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J Immunol* 149: 3525
- 143.Nestle FO, Zheng X-G, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ (1993) Charakterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151: 6535
- 144.Köck A, Schwarz T, Kernbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172: 1609
- 145.Boon T, Cerottini J-C, Van den Eynde B, Van der Bruggen P, Van Pel A (1994) Tumor antigens recognized by lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12: 337
- 146.Matthews M and Neale ML (1987) Cytotoxicity assays for tumor necrosis factor and interferons - a practical approach. Editors: Clemens MJ, Morris AG and Gearing AJH. *IRL Press pp: 221*