

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Charakteristische Aspekte des Migrationsverhaltens kutaner dendritischer Zellen im Humansystem

Lukas, Michael Alexander

1996

**CHARAKTERISTISCHE ASPEKTE
DES MIGRATIONSVERHALTENS
KUTANER DENDRITISCHER ZELLEN
IM HUMANSYSTEM**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doctor medicinae universae"
an der Leopold-Franzens Universität zu Innsbruck

Erarbeitet im
Immunologischen Labor / Abteilung für Experimentelle Dermatologie
der Univ.- Klinik für Dermatologie und Venerologie
Anichstraße 35, 6020 Innsbruck
(Vorstand: Univ.- Prof. Dr. Peter Fritsch)

Eingereicht von

Cand. med. Michael Alexander LUKAS

Innsbruck, März 1996

Auszüge der vorliegenden Arbeit werden im
Journal of Investigative Dermatology
unter dem Titel
"HUMAN DENDRITIC CELLS MIGRATE THROUGH LYMPHATIC VESSELS
IN A SKIN ORGAN CULTURE MODEL"
publiziert. (1996, in press)

UB INNSBRUCK



+C44448200



VORWORT

Obleich die Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit in bezug auf die Erlangung der Doktorwürde der Medizin in Österreich keine *conditio sine qua non* darstellt, so ist diese Variante jedoch gleichsam die aufregendste und faszinierendste. Auch wenn der Weg bisweilen einer Wanderung durch die Wüste gleicht: das Ziel in weiter Ferne, die Schritte schwer und stets der Zweifel, im Kreis zu gehen. Doch wie groß sind angesichts so mancher vergangener Mühe, Erleichterung und Freude über die Entdeckung einer "Oase", die auch dem Näherkommen standhielt und sich dabei nicht, wie andere zuvor, verflüchtigte. Wie euphorisierend, sollte der schwache Schein wissenschaftlichen Strebens einen Ort jenes Wunders Natur erleuchtet haben, über welchen bis dato der Mantel der Dunkelheit gebreitet war. Dieses Erlebnis beglückt in höchstem Maße und macht nachdenklich zugleich.

Mein Dank gilt im folgenden all jenen Menschen, welche mich während meiner Arbeit unterstützten und mir so Zugang zu einer Welt verschafften, welche mich in hohem Maße in ihren Bann zog. Die Zeit im Labor mit ihren mannigfaltigen Impressionen wird sich künftig in meinem Gedächtnis vermischen mit den Erinnerungen an eine noch unbeschwerte Zeit an der Schwelle zum Berufsleben.

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. P. Fritsch möchte ich dafür danken, daß er mich an seiner Klinik willkommen hieß und mir die Möglichkeit gab, ebendort meine Dissertation zu verfassen.

Herrn Ao. Univ.- Prof. Dr. med. G. Schuler (seit 1.9.1995 Direktor der Universitätsklinik für Dermatologie in Erlangen), meinem *Doktorvater*, schulde ich Dank für viele grundlegende und prinzipielle Hilfestellungen, Anregungen und Diskussionen. Sein Enthusiasmus für die Wissenschaft war zwangsläufig ansteckend und motivierte mich in besonderer Weise.

Herrn Univ.- Doz. Dr. rer. nat. N. Romani möchte ich meinen herzlichsten Dank dafür aussprechen, daß er immer und überall ein offenes Ohr für mich hatte, mir bei der Beseitigung "labortechnischer Alltagsprobleme" zur Seite stand und durch seine leichte Erreichbarkeit zwangsläufig zum Objekt meiner Begierde wurde, was Diskussionen betraf. Er war immersprudelnde Quelle neuer Anregungen und "Fels in der Brandung".

Weiters danke ich

Herrn Univ.- Doz. Dr. med. N. Sepp, der mich auf sehr nette und hilfsbereite Weise das erste halbe Jahr unterstützte und motivierte,

Frau D. Reider-Brang (MTA), die mich freundlicherweise in die Art und Weise labortechnischen Arbeitens einwies, mir Tips gab und immer wußte, was wo zu finden bzw. wie zu verwenden sei,

Frau H. Stössl (MTA), die unermüdlich für mich Semi-, und Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie anfertigte,

Herrn Dr. phil. F. Koch, Frau B. Trockenbacher, Frau S. Kind, Frau U. Stanzl für die zahlreichen Hilfestellungen vor allem zu Beginn meiner Arbeit.

Im Zentrum meiner Dankbarkeit jedoch stehen Menschen aus dem Kreise meiner Familie, die mich von Anfang an und zu jeder Zeit mit aller Kraft unterstützten und förderten. Ihnen widme ich diese Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungen	7
Glossar	7
<u>I. EINLEITUNG</u>	<u>8</u>
A. Die Haut als Immunorgan	8
B. Langerhanszellen	8
1. Geschichtlicher Rückblick	8
2. Vorkommen, Dichte	9
3. Phänotypische und funktionelle Marker	9
4. Herkunft, Einordnung	9
C. Das System Dendritischer Zellen	9
1. Die Dendritische Zellreihe	9
2. Charakteristika	10
3. Vorkommen	10
4. Reifung Dendritischer Zellen	11
5. Komponenten Dendritischer Zellfunktion	13
(a) Wachpostenfunktion	13
(b) Migratorische Funktion	14
(c) Adjuvante Funktion	14
D. Fragestellung	16
<u>II. MATERIAL & METHODIK</u>	<u>17</u>
1. Kulturmedium	17
2. PBS(phosphate buffered saline)	17
3. Phosphatpuffer	17
4. Ammoniumthiocyanatlösung	17
5. Humane Haut	17
6. Organkultur humaner Haut	18
6.1. Vorbereitung der Haut	18
6.2. Organkultur	18
7. Herstellung von Gefrierschnitten	20
7.1. Beschichtete Objektträger	20
7.2. Gefrierschnitttechnik	20
8. Indir. Immunperoxidasefärbung von Gefrierschnitten	20
8.1. Vorbereitung	20
8.2. Färbesequenz	21
9. Herstellung epidermaler "sheets" und Gewinnung von Dermis	22
10. Färbung epidermaler "sheets"	23
11. Eine neue Methode der sequentiellen Dermis-	24
Aufbereitung als Grundlage für die Herstellung	
"humaner dermaaler sheets"	
11.1. Einleitende Vorbemerkungen	24
11.2. Prämissen	25
11.3. Prinzip	25
11.4. Ergebnis	25
11.5. Technik	25

11.6. Immunhistochemie "Dermaler Transversalschnitte"	27
12. Herstellung und Färbung von Zytozentrifugenpräparaten	27
12.1. Ernten der Zellen	27
12.2. Herstellung der Präparate	27
12.3. Immunhistochemie	27
13. Elektronenmikroskopie	28
14. Mikroskopische Befundung und Auswertung	28
14.1. Phasenkontrast	28
14.2. Durchlicht	28
14.3. Immunfluoreszenz	28
14.4. Ermitteln der Langerhanszellichte	29
14.5. Photographische Dokumentation	29
15. Tabellarische Antikörperübersicht	30
<u>III. ERGEBNISSE</u>	<u>32</u>
A. Langerhanszellen verlassen die Epidermis während der Organkultur	32
1. <i>Der Gefrierschnitt-Simultane Beurteilung von Epidermis und Dermis</i>	32
1.1. Das CD1 Antigen	32
1.1.1. Subcluster CD1a	32
1.1.2. Subcluster CD1b	34
1.1.3. Subcluster CD1c	34
1.2. MHC Klasse II Antigene	34
1.3. Langerhanszellgranula (Birbeck-Granula)	35
2. <i>Das epidermale Häutchenpräparat ("sheet"-Präparat)</i>	36
2.1. LC-Morphologie und Expression von CD1a, MHC Klasse II sowie LC-Granula im Verlauf der Organkultur	37
2.1.1. CD1 Antigen	37
2.1.2. MHC Klasse II	37
2.1.3. Langerhanszellgranula	38
3. <i>Epidermale Emigrationskinetik</i>	39
3.1. Emigrationskinetik im klassischen Organkultursystem	39
3.2. Emigrationskinetik im "Epidermis-only" - System	41
B. Langerhanszellen emigrieren in die Dermis während der Organkultur	42
1. <i>Standard-Organokultur</i>	42
1.1. Die Dermis zum Zeitpunkt "Null Stunden"	43
1.2. Die Dermis zum Zeitpunkt "24 Stunden"	43
1.3. Die Dermis zum Zeitpunkt "33 Stunden"	43
1.4. Die Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden"	43
1.5. Die Dermis zum Zeitpunkt "72 Stunden"	44
2. <i>Die "Dermis-only" - Kultur</i>	46
2.1. Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden" (standard)	47
2.2. Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden" (invert)	47
C. Langerhanszellen akkumulieren in afferenten Lymphgefäßen	47
1. Untersuchung der räumlichen Beziehung sämtlicher Akkumulationsmuster zum dermalen Blutgefäßsystem	47
2. Ergebnisse der Semidünnschnitt-Auswertung	50
3. Ergebnisse der Ultradünnschnitt-Auswertung	50

D. Mechanismus der Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis	53
(a) Ansätze zur Stimulation der Emigration	53
1. Versuche mit 2,4,6,-Trinitrochlorobenzol (TNCB)	53
2. Versuch der Stimulation durch Zytokine	54
2.1. Tumornekrose-Faktor alpha (TNF-alpha)	55
2.1.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula	55
2.1.2. Einflüsse auf die Emigrationskinetik	55
2.1.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse in der Dermis	55
2.2. Granulozyten/Makrophagen-Colonie Stimulierender Faktor (GM-CSF)	55
2.2.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula	55
2.2.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik	56
2.2.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse in der Dermis	56
2.3. Interleukin-1 alpha, Interleukin-1 beta	56
2.3.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula	56
2.3.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik	56
2.3.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse in der Dermis	57
2.4. Zytokin-"Cocktail" (TNF-alpha, GM-CSF, IL-1)	57
2.4.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula	57
2.4.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik	57
2.4.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse in der Dermis	58
(b) Ansätze zur Hemmung der Emigration	58
1. Versuche der physikalischen Emigrationshemmung durch Kühlung	58
1.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik	58
1.2. Einfluß auf die Akkumulationsvorgänge in der Dermis	59
2. Versuch der Emigrationshemmung durch Anti-TNF-alpha	59
2.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik	59
2.2. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse in der Dermis	60
2.3. Emigrationshemmende Wirkung von Anti-TNF-alpha im "Epidermis-only" - System	60
2.3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik	61
3. Versuch der Emigrationshemmung durch löslichen humanen TNF-Rezeptor	61
3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem	61
3.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik im "Epid.-only" - System	62
4. Versuch der Emigrationshemmung durch Interleukin-1-Rezeptorantagonist-Protein	62
4.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem	62
4.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik im "Epid.-only" - System	63
(c) Expression von Adhäsionsmolekülen	63
1. E-Cadherin	64
2. CD44-Molekül	64
3. Alpha-4 Integrin	65
4. Kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen (CLA)	65
E. Charakterisierung emigrierter kutaner dendritischer Zellen	66
1. Immunhistochemische Charakterisierung	67
1.1. Expression von CD80/B7-BB1	67

1.2. Expression von CD86/B7-2	67
1.3. Expression von CD40	68
1.4. Expression von CD83	68
1.5. Expression von TRAP (humaner CD40-Ligand)	68
1.6. Einfluß von Zytokinen auf die Expression von CD80, CD86 und CD40	68
2. Funktionelle Charakterisierung	69
<u>IV. DISKUSSION</u>	<u>70</u>
1. <i>Eignung des Organkulturmodells zur Untersuchung der Migration</i>	70
2. <i>Morphologische und phänotypische Veränderungen während der Migration</i>	71
3. <i>Migration via afferente dermale Lymphgefäße</i>	73
4. Stimulation der Migration	74
4.1. Mechanisches Trauma	74
4.2. Kontaktallergen-Applikation	75
4.3. Zytokine	75
5. <i>Mechanismen der Emigration-Die Rolle von Adhäsionsmolekülen und Chemotaxis</i>	77
<u>V. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>79</u>

ABKÜRZUNGEN

AG	Antigen
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
(D)DC	(Dermale) Dendritische Zelle(n)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
IL	Interleukin
LC	Langerhanszelle(n)
(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
m-...	Milli-...
MHC	Major Histocompatibility Complex
n-...	Nano-...
PBS	Phosphate buffered Saline
TNCB	2,4,6-Trinitro-1-chlorobenzol
TNF	Tumornekrose-Faktor
µ-...	Mykro-...
U	Unit(s)

GLOSSAR

"R10"	In unserem Labor in Innsbruck jargonhaft verwendete Kürzel für ein Standard-Kulturmedium mit <i>10%igem Serumanteil</i> (siehe Kap.II: Material&Methodik)
"sheet"	Aus dem Englischen "sheet" = (u.a.) "Blatt"; in der dermatologischen Forschung etablierter Begriff für eine flächenhafte dünne Gewebsschicht wie z.B. die gesamte Epidermis ("epidermales sheet") oder die bzw. Teile der Dermis ("dermales sheet").
"well"	U.a. englischer Begriff für "eingelassener Behälter"; bezeichnet im Labor einzelne, meist in in transparente Kunststoffplatten eingepresste zylinder-, oder umgekehrt-kegelförmige Vertiefungen, die gleichsam als kleinste "Reagenzgefäße" mit einem Fassungsvermögen von wenigen µl bis zu einigen ml z.B. der Zellkultur oder der Durchführung definierter chemischer oder immunologischer Reaktionsabläufe dienen. Ihre Anzahl/Platte schwankt - je nach Größe des "wells" - z.B. zwischen 6 und 96/Platte.

I. EINLEITUNG

A. DIE HAUT ALS IMMUNORGAN

Während in der Vergangenheit das Hautorgan vorwiegend als Ziel immunologischer Reaktionen gesehen wurde, haben Fortschritte der Grundlagenforschung gezeigt, daß die Haut, vor allem aber die Epidermis, Initiator einer Immunantwort sein kann.

Trotz ihres einfachen und uniformen histomorphologischen Aufbaus ist die Epidermis ein hochkomplexes Organ, das neben Keratinozyten und Melanozyten Zellpopulationen enthält, welche aus dem Knochenmark stammen. Sie enthält Antigen-präsentierende "Langerhanszellen", produziert eine Reihe immunmodulatorischer Zytokine und enthält eine, vorderhand nur im murinen System nachgewiesene, distinkte T-Zellpopulation (1-6).

Sowohl stimulierende als auch unterdrückende Signale, die entweder zu Sensibilisierung oder Immuntoleranz führen, entstehen nach Antigenexposition in der Epidermis selbst und gehen von distinkten Zellsystemen aus. Während sensibilisierende und tolerogene Signale unter den üblichen Bedingungen derart gewichtet sind, daß "Langerhanszell-medierte" Sensibilisierung überwiegt, führt eine Unterdrückung der Langerhanszellfunktion zu einem Überwiegen des suppressorischen Regelkreises (7).

Die strukturelle und antigene Ähnlichkeit zwischen Epidermis und Thymus, die Sekretion regulatorischer Zytokine durch Keratinozyten, die Wanderung von Lymphozyten in die Epidermis (wie dies bei bestimmten Hauterkrankungen der Fall ist), sowie die Art der T-Zellrezeptor-Expression (gamma/delta T-Zellrezeptor) auf (murinen) dendritischen epidermalen T-Zellen (DETC), sog. "Thy-1 + Zellen" läßt vermuten, daß die Epidermis Ort postthymischer oder extrathymischer Reifung sein könnte (4,8).

Welche Bedeutung der Dermis in diesem komplexen System zukommt, ist noch unklar. Auch über das System "Dermaler Dendritischer Zellen" ist noch relativ wenig bekannt (9).

B. LANGERHANSZELLEN

1. Geschichtlicher Rückblick

Entdecker und Namensgeber dieser Zellen war *Paul Langerhans*, der 1868, noch während seiner Zeit als Medizinstudent in Berlin in der suprabasalen Schicht Goldchlorid-impregnierter humaner Epidermis stark verzweigte (dendritische) Zellen entdeckte (10). Er hielt diese für *Nervenzellen*. Auch andere Autoren verfolgten diesselbe Theorie und sprachen von einem *intraepidermalen Nervensystem*.

Erst in den 50iger und 60iger Jahren unseres Jahrhunderts trat eine Änderung der Sichtweise ein. So etwa verfolgte Masson eine Theorie, wonach es sich bei LC um *sterbende Melanozyten* handeln sollte.

Daß dem nicht so war, vermochte 1961 die Gruppe um Birbeck zu zeigen (11). Anhand elektronenmikroskopischer Methoden konnte neues Wissen akkumuliert werden. Mit Entdeckung der sogenannten "Birbeck-Granula" sollte zudem ein essentielles Kriterium für die zukünftige Identifikation von LC zur Verfügung stehen.

Die Arbeiten von Basset et al. bekräftigten die Theorie der mesenchymalen Herkunft der LC.

Als schließlich erkannt wurde, daß sich auf der Oberfläche von LC Komplement-Rezeptoren (12,13) sowie MHC Klasse II Moleküle befinden und die Herkunft der LC aus dem Knochenmark eindeutig gezeigt worden war, begann eine neue Ära, die immer deutlicher die Einbindung der LC in *immunologische Funktionen* erkennen ließ.

Bald darauf war es evident, daß LC *potente Stimulatoren antigen-spezifischer proliferativer und zytotoxischer Immunantworten* sind (14-18).

Somit war am Ende aus der vermeintlichen Nervenzelle eine potente immunstimulatorische Zelle geworden. Details in (19).

2. Vorkommen, Dichte

LC kommen sowohl in der Haut als auch in anderen geschichteten Plattenepithelien von Säugern vor. In der menschlichen Epidermis nehmen sie eine *basale bis suprabasale* Position ein und sind in einer Dichte von 460 - 1000 Zellen per mm² vertreten. Obgleich sie zahlenmäßig nur 1-3% aller epidermalen Zellen ausmachen, so sind sie doch aufgrund ihrer langen Fortsätze (Dendriten) in der Lage, die gesamte Epidermis netzförmig zu überspannen.

3. Phänotypische und funktionelle Marker

Die wichtigsten Marker, mittels derer sich LC histo-, bzw. immunhistochemisch nachweisen lassen, sind: (1) *common leukocyte antigen CLA = T 200 = CD45*, (2) *Fc IgG-Rezeptoren = CD32*, (3) *Rezeptoren für bestimmte Komplement-Komponenten = CD11b*, (4) *CD 1a Antigen*, (5) *CD4 Antigen (nur human)*, (6) *MHC Klasse I*, (7) *MHC Klasse II*, (8) *Adenosintriphosphatase*, (9) *S-100 Protein* sowie (10) *Birbeck - Granula*.

Von Bedeutung sind hier das CD1a Antigen, von dem man ursprünglich geglaubt hatte, daß es ausschließlich und selektiv auf Thymozyten exprimiert würde. *Spezifisch für LC in der epidermalen Umgebung sind von den aufgeführten Markern (2), (3), (4), (7), (8) und (10)*. Die in der Praxis gebräuchlichsten Moleküle zur Identifikation humaner epidermalen LC sind CD1a und MHC Klasse II.

Aus funktionellen Gründen besonders wichtig ist die Expression von Allo-Antigenen, die durch den MHC kodiert werden. So sind LC die einzigen Epidermalzellen, welche unter Normalbedingungen, d. h. in normaler, nicht stimulierter oder pathologisch veränderter Epidermis MHC Klasse II Allo-Antigen synthetisieren und exprimieren (20,21). Beim Menschen erfolgt die Kodierung durch die HLA-DR/DP/DQ Loci. Hier sei zudem darauf hingewiesen, daß der Phänotyp der LC nicht eine stabile Eigenschaft darstellt, sondern vom Reife-, und Differenzierungsgrad dieser Zellen abhängt (siehe auch später).

4. Herkunft, Einordnung

LC stammen aus dem Knochenmark (siehe später) und sind Teil des "Systems Dendritischer Zellen". Trotz eindeutiger Abgrenzung zum "System der Monozyten und Makrophagen" weisen residente LC auch Eigenschaften mononukleärer Phagozyten auf, wie etwa Fc IgG-, oder Komplementrezeptoren, ATPase und Esterase-Aktivitäten auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde anfänglich über eine ontogenetische Brücke zwischen dem System der Mononukleären Phagozyten und jenem der Dendritischen Zellen spekuliert. Diese Einschätzung ist aber nach heutigem Wissen nicht haltbar.

C. DAS SYSTEM DENDRITISCHER ZELLEN

Dendritische Zellen bilden ein komplexes System weitläufig verteilter Antigen-präsentierender Zellen, welche dazu spezialisiert sind, primäre Immunantworten zu initiieren (22).

1. Die Dendritische Zellreihe

DC entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Daß solche Präkursoren existieren ist bekannt (23-27). Ihre Zellreihe innerhalb der myeloiden, ist eine eigenständige. Inaba und Schuler vermochten zu zeigen, daß *Mausblut* Progenitoren enthält, aus welchen sich unter dem Einfluß von GM-

CSF große Mengen von DC züchten ließen (28). Eine derartige Induktion dendritischen Zellwachstums gelang zudem aus Präkursoren des *murinen Knochenmarks*. Auch in diesem Fall erwies sich GM-CSF dafür als essentiell (29). Ähnliche Befunde erhielt man für das *Humansystem*. Um aus CD34+ Progenitoren DC zu generieren, bedurfte es der Kombination von GM-CSF und TNF-alpha (30). Dieses Vorgehen erwies sich auch für Versuche mit *humanem Nabelschnurblut* als erfolgreich. Um aus Progenitoren des *peripheren menschlichen Blutes* größere Mengen von DC zu gewinnen, war jedoch außerdem IL-4 notwendig (31).

Trotz gewisser Teilerfolge gelang es bis dato nicht, eine Progenitorzelle für jene putative dendritische Zelllinie zu isolieren und genau zu charakterisieren.

2. Charakteristika

DC weisen eine Reihe von spezifischen Merkmalen auf, welche eine deutliche Abgrenzung zum System der Monozyten und Makrophagen ermöglichen. Diese Eigenschaften sind jedoch nicht konstant, sondern verändern sich im Zuge der Reifung von DC (siehe dort).

(1) Während in Geweben *residierende* DC, wie beispielsweise LC in der Epidermis, multiple Fortsätze (Dendriten) aufweisen, die im Querschnitt rund erscheinen und welche Zellorganellen beinhalten, entwickeln *kultivierte* DC dünne, segelartige Zytoplasma-Fortsätze, sogenannte "veils" (engl.). Diese sind typischerweise frei von jeglichen Organellen und werden außerdem permanent aktiv ausgestreckt und wieder retrahiert. Ein Verhalten, das bei keinem anderen Leukozytentyp beobachtbar ist (32,33).

(2) Eine weitere Eigenschaft, welche auf residente oder frisch isolierte, insbesondere aber auf kultivierte LC zutrifft, ist die Expression von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche (34).

(3) Hingegen mangelt es den DC an hoher Expression typischer Marker der Monozyten/Makrophagen-Linie (z.B. CD14, CD68).

(4) Gleichfalls relativ geringfügig ausgeprägt ist die phagozytotische Potenz, sowohl frisch isolierter als auch kultivierter LC (32,35).

(5) DC spielen eine entscheidende Rolle bei der Auslösung primärer, T-Zell mediierter Immunität. In Abhängigkeit ihres Reifezustandes (siehe dort) sind sie entweder exzellente Antigen-Prozessoren oder aber - mit bereits prozessiertem Antigen - potente Stimulatoren ruhender, naiver T-Lymphozyten (22,36).

3. Vorkommen

DC okkupieren 3 Kompartimente des Organismus:

(a) Nicht lymphatische Organe

In der *Haut* kommen DC sowohl in der Epidermis i.e. LC (32,34) als auch in der Dermis (9,32,37-39) vor. Nicht zuletzt aufgrund ihrer relativ einfachen experimentellen Verfügbarkeit wurden die epidermalen LC rasch zum Paradebeispiel einer, im nicht lymphatischen Gewebe residenten DC.

Auch in den *Atemwegen*, insbesondere in den Epithelien und Alveolarsepten (40-45) fand man DC, welchen, so wie den DC der lymphatischen Organe eine sehr starke T-Zell stimulatorische Aktivität eigen war.

Fabre, Hart und McKenzie konnten zeigen, daß das Interstitium *vieler Organe* mit Ausnahme des Gehirns stark MHC Klasse II sowie CD45 positive DC enthält (46). Larsen et al. lieferten im Rahmen von Herz-

Transplantationen im murinen System Hinweise auf die Migration DC aus dem Spenderherzen in die Empfänger Milz (47). Die DC im Herz wurden mittlerweile charakterisiert (48).

In der *Leber* entdeckte man DC *in situ* vor allem im Bereich der Portalfelder (vgl. im Gegensatz dazu Kupffer'sche Zellen entlang der Sinus) (49). Diese DC wurden erst kürzlich isoliert (50). Gleiches gilt für DC aus der Niere (48).

DC der *Pankreasinseln* werden für Transplantatabstoßungsreaktionen in experimentellen Ansätzen verantwortlich gemacht (51) und auch der *Darm* enthält DC, vorwiegend in der Lamina propria gelegen (52,53).

(b) Zirkulation

Afferente Lymphe enthält DC mit besonders ausgeprägten "veils" (23,54-58). Weniger als 0.1% aller, im *Blut* zirkulierenden Leukozyten sind DC. Es handelt sich dabei vermutlich um solche DC, welche aus dem Knochenmark kommend, in die nicht lymphatischen Gewebe unterwegs sind. Diese DC konnten mit diversen, in der Regel langwierigen Techniken aus dem Blut isoliert, angereichert und charakterisiert werden (59-63).

(c) Lymphatische Gewebe

Hier erstreckt sich das Vorkommen DC neben dem *Thymusmark* (27,64) v.a. auf die *T-Areale der peripheren lymphatischen Organe*. Hier wurden sogenannte "Interdigitierende Zellen" beschrieben, welche sowohl zytologisch als auch phänotypisch den DC entsprechen (65,66). Austyn et al. bemerkten eine spezifische Ansiedelung ("homing") experimentell peripher applizierter DC (67), wobei über die Effizienz dieses "homings" allerdings noch wenig bekannt ist. Möglicherweise werden nur jene DC aufgefangen, welche eine, zu ihrem "zur Schau getragenen Antigen" spezifisch passende T-Zelle finden. Obgleich der Flux von DC bis zu 10^5 Zellen pro Stunde betragen kann, konnte bisher noch keine Akkumulation DC im Lymphknoten oder in der efferenten Lymphe gefunden werden. Bezugnehmend auf den substantiellen "turn-over" in Lymphe und Milz (23,24) dürften die meisten DC nach Erreichen des lymphatischen Organs durch Apoptose zugrunde gehen. DC aus der Milz stellen die bestuntersuchte Population einer im lymphatischen Gewebe residierenden DC dar. Seit ihrer Entdeckung durch Steinman und Cohn (68,69) wurden die Methoden der Isolation und Anreicherung ständig verbessert (70-72). Beim Sortieren von DC aus frischen Milzsuspensionen zeigte sich, daß sich lediglich eine Subpopulation klar mit dem mAK NLDC145 immunhistochemisch anfärben ließ, einem gegen die interdigitierenden Zellen der zentralen periarteriolen Lymphscheide gerichteten Antikörper (73,74). Im Schnitt entdeckte man Nester von DC in der Peripherie der T-Areale (75,76). Dies zeigt, daß DC wie Türen positioniert sind, durch welche die T-Zellen den arteriellen Schenkel in der Marginalzone verlassen. Möglicherweise enthalten die lymphatischen Organe 2 Populationen von DC, eine "periphere" kurzlebige, sowie eine "zentrale" langlebige aus interdigitierenden Retikulumzellen. Im wesentlichen machen die DC in den lymphatischen Organen weniger als 1 % aller Zellen aus.

4. Reifung Dendritischer Zellen

Es ist bekannt, daß weiße Blutzellen nach ihrer Entstehung im Knochenmark eine extensive weitere Differenzierung erfahren, bis sie ihre volle immunologische Funktion zu entfalten imstande sind. Beispielsweise müssen B- und T-Lymphozyten erst lernen, Antikörper zu produzieren bzw. Lymphokine oder Zytolysine zu synthetisieren.

Auch DC beginnen ihren Lebenszyklus im Knochenmark, wo sie aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen. Nachdem sie das Organ ihrer Entstehung verlassen haben, existieren sie primär als unreife Formen, die erst in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium ihre charakteristische phänotypische und

funktionelle Ausprägung erfahren. Legitimation findet dieses Konzept durch die Ergebnisse zahlreicher *in vitro* Untersuchungen mit frisch isolierten und kultivierten LC. Es zeigte sich, daß epidermale LC eine *morphologische, phänotypische und funktionelle Metamorphose* durchlaufen und letztendlich zunehmend die Gestalt und Funktion jener DC annehmen, wie sie typischerweise in den lymphatischen Organen vorkommen (36). Werden beispielsweise LC in Gegenwart von Keratinozyten oder exogenem GM-CSF (77,78) kultiviert, so entwickeln sie ausgeprägte "veils" und reduzieren (Mensch) bzw. verlieren (Maus) die sog. Birbeck-Granula. Sie sind zu diesem Zeitpunkt von klassischen DC der Milz (Maus) oder des Blutes (Mensch) nicht mehr zu unterscheiden (36,79,80). Weiters spiegelt sich die phänotypische Angleichung in einer bis zu 5-fachen Zunahme von MHC Klasse II (34,79-83) wider. Zudem erfolgt gleichfalls eine Hinaufregulation bestimmter, in die T-Zell Interaktion involvierter Adhäsionsmoleküle wie CD54/ICAM-1 (79,82,84), CD58/LFA-3 (82) und CD80 bzw. CD86/B7 kostimulatorische Moleküle (85-88), andererseits gleichzeitig eine starke Reduktion der Expression bestimmter Makrophagenmarker wie ATPase oder unspezifischer Esterase (36,79,80).

Schon nach kurzer Zeit in Kultur multiplizieren frisch isolierte LC ihre bis dato schwache T-Zell stimulierende Kapazität um das bis zu 100-fache (80,89) und erreichen somit Werte, die sonst nur Milz-DC erreichen. Diese plötzliche Zunahme akzessorischer Kompetenz läßt sich nicht etwa auf die starke Zunahme von MHC Klasse II Molekülen zurückführen. Denn LC, welche zwölf Stunden kultiviert worden waren und die Expression von MHC Klasse II Molekülen bereits vollständig aufreguliert hatten, erwiesen sich als (noch) schwache T-Zell Stimulatoren (80). Vielmehr ist dafür der Umstand verantwortlich, daß sehr wohl kultivierte, nicht aber frische LC, dazu imstande sind, ruhende T-LZ in einer "Antigen-unabhängigen Weise" zu binden (= "clustering") (89,90). Die Expression des dafür verantwortlichen, noch nicht identifizierten Moleküls (91), sowie der weiteren Adhäsions- und Kostimulatormoleküle verleiht den DC ihre exzeptionelle Stimulationsfähigkeit für ruhende, naive T-Zellen.

Die Arbeit von Stingl et al. (14) wies eindeutig darauf hin, daß LC effiziente, Antigen auf eine Klasse II restringierte Weise präsentierende Zellen sind.

Diese Fähigkeit frischer LC (92,93) wird während der Kultur größtenteils reduziert, lediglich die Präsentation kleiner Peptide, welche keiner intrazellulären Prozessierung bedürfen, bleibt erhalten (92).

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, daß frische LC hervorragende Antigen-Prozessoren sind, gleichzeitig aber schwache T-Zell-Stimulatoren. Die als "Reifung" verstandenen oben beschriebenen Veränderungen führen dazu, daß auf die kultivierten LC jene Attribute in genau umgekehrter Weise zutreffen.

Das Konzept der Reifung DC versucht, basierend auf *in vitro* erhobenen Daten, den Lebenszyklus und die Mechanismen, welche *in vivo* zur Immunantwort führen, zu erklären. Demnach entstehen DC im Knochenmark aus bisher unbekanntem Präcursorzellen, wandern dann in die peripheren Gewebe und verharren dort als "unreife DC". Dieser Prozeß ist bisher wenig verstanden (94). Unreife DC formieren in der Peripherie ein Reservoir von DC, welche, so scheint es, nach antigenem Stimulus in die lymphatischen Organe auswandern um dort als mittlerweile "gereifte DC" eine primäre Immunantwort zu initiieren. Aufgrund der Tatsache, daß in der efferenten Lymphe keine DC gefunden wurden, ist anzunehmen, daß DC keiner Rezirkulation unterliegen und die lymphatischen Organe somit Endstation im Lebenszyklus DC sind (79,80,92,93,95).

Genauere Daten zur Regulation dieses Reifungsprozesses sind noch ausständig. Anhaltspunkte sind lediglich die Triggerung der Maturation *in vitro* durch GM-CSF (77,78,96,97) sowie die Aufrechterhaltung der DC-Viabilität durch TNF-alpha (98) und GM-CSF. Auch für IL-1 alpha konnte experimentell ein *indirekter*, über vermehrte Freisetzung von GM-CSF erfolgender T-Zell stimulierender Effekt nachgewiesen werden (77,97,99). *In vivo* dürfte eine außerordentlich delikate Balance zwischen auf- und abregulierenden Zytokinen dafür verantwortlich sein, ob aus antigenem Kontakt Immunität oder Toleranz resultiert.

Table 1: Reifung epidermaler Langerhanszellen - Überblick über funktionelle Eigenschaften

Kulturdauer	frisch isoliert	12-72 h
Präsentation löslicher Proteinantigene	+++	+/-
Präsentation von Peptiden	+++	+++
Präsentation von Allo-MHC/Mitogene	+	+++
Präsentation von MHC I/II, invariant chain	+++	-
Saure endozytotische Vakuolen	+++	+
Oberflächen-Adhäsions-/kostimulatorische Moleküle	+/-	+++
Fc-Rezeptoren	+	+/-

5. Komponenten Dendritischer Zellfunktion Akzessorische Funktion

DC besitzen in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen besondere Eigenschaften. Die Summe dieser verschiedenen Qualitäten verleiht ihnen ihre herausragende Effizienz bei der Stimulation naiver T-Zellen.

(a) Wachpostenfunktion peripherer Dendritischer Zellen

Periphere unreife DC sind aufgrund ihrer strategisch günstigen Lage in Gebieten mit hoher Wahrscheinlichkeit antigener Exposition dazu prädestiniert Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Die Mechanismen der sog. "antigen-capture" sind speziell adaptiert (100,101), wenn auch zum Teil nur während einer relativ kurzen Zeitspanne im Leben der DC (35,102). Obgleich der im Vergleich zu "professionellen" Phagozyten relativ geringen Aufnahmekapazität für AG (89,92), sind LC doch in ausreichendem Maße dazu befähigt, eine für eine effiziente T-Zell Stimulation notwendige Anzahl an Liganden i.e. MHC Klasse II/Peptidkomplexe zu generieren (103,104). Obgleich DC große Mengen Antigen-präsentierender Moleküle exprimieren, sind doch für eine spätere suffiziente T-Zell Stimualtion geringe Mengen des präsentierten Antigens ausreichend (105). Außerdem können DC Antigen über längere Perioden in immunogener Form behalten (93,105,106). Von besonderer Bedeutung für die Antigen-Präsentation dürfte zudem ein distinktes endozytotisches vakuoläres System (93,106,107) sein, ähnlich den sog. "CILV" (i.e. Class II MHC vesicles) (108).

Die Effizienz, mit der unreife DC lösliche Proteinantigene zu prozessieren imstande sind, konnte beispielhaft anhand frisch isolierter LC demonstriert werden, grundsätzlich (93), sowie in Variationen (92,109). Vergleichende Studien an unreifen und reifen DC hinsichtlich der AG-Prozessierungspotenz (101) ersterer brachten ans Licht, daß diese sich bei frisch isolierten LC in einer großen Anzahl saurer Endosomen widerspiegelte, kultivierte LC hingegen, dieser Organellen weitgehend entbehrten (107). Wahrscheinlich ist, daß diese Organellen mit jener Aufgabe betraut sind, die für eine Präsentation von Protein-AG an T-Zellen typischerweise notwendig ist, nämlich der intrazellulären enzymatischen Degradierung von Proteinen zu kleinen Peptiden und deren folgende Assoziation mit MHC Klasse II Molekülen (110). Die Syntheserate von MHC Klasse II ist in frisch isolierten LC hoch, ebenso wie jene von "invariant chain". Beide tendieren mit fortschreitender Reifung und somit abnehmender Prozessierungspotenz rückläufig (92,95,111). Es gibt Hinweise dafür, daß "invariant chain" die Peptidbindungsstelle während der Biosynthese besetzt und diese erst wieder nach Erreichen des endozytotischen Systems freigibt, um die Anlagerung prozessierten Antigens zu ermöglichen (112). Während die Expression von "invariant chain" im Verlauf der Kultur stark abnimmt (92,95), bleibt jene der MHC Klasse II an der Zelloberfläche unverändert hoch (79,80,83). Biochemische Untersuchungen vermochten dies mit einer langen Halbwertszeit dieser Moleküle zu erklären (95). Die Fähigkeit der AG-Prozessierungs- und Präsentationspotenz konnte auch in Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden (113). Hinsichtlich der DC der Haut bediente man sich eines *Kontaktallergiemodells*. So fand man, daß DC in den

drainierenden Lymphknoten jenes Kontaktallergen trugen, welches zuvor epikutan appliziert worden war (114). Die Gruppe um Hauser (115,116) zeigte auf, daß T-Zellen, welchen *in vitro* prozessiertes AG in immunogener Form durch LC präsentiert worden war, nach deren Transfer in normale Mäuse ebendort eine spezifische Kontaktsensibilisierung induzieren konnten (115).

Die Annahme einer Wachpostenfunktion epidermaler LC konnte zudem durch Studien von Toews et al. (117) insoferne bekräftigt werden, als daß AG-Applikation auf Haut, deren epidermale LC zahlenmäßig zuvor durch UV-Bestrahlung dezimiert worden war, keine Sensibilisierung, sondern ganz im Gegenteil, Toleranz induzierte.

Welche Rolle die sogenannten "Dermalen Dendritischen Zellen" im Rahmen der Wachpostenfunktion spielen, ist noch unklar, möglicherweise wirken sie unterstützend (118,119).

Über eine regulative Einflußnahme von Zytokinen auf AG-Aufnahme und Prozessierung ist wenig bekannt. Aufgrund der bereits erwähnten Bedeutung der MHC Klasse II Moleküle wäre zu erwarten, daß Zytokine, welche deren Synthese beeinflussen, wie *Interferon gamma*, *TNF-alpha* oder *IL-4* entsprechende Effekte zeigen. Jedoch liegen hierzu keine systematischen Untersuchungen vor. Einige Beobachtungen weisen auf eine durch TNF-alpha bedingte Repression der AG-Präsentationsfähigkeit hin, welche möglicherweise durch Verlust bereits prozessierter immunogener Peptide aus der Peptidbindungsgrube des MHC Klasse II Moleküls bedingt ist (120).

In *in vivo* Experimenten konnten Vermeer&Streilein beobachten, daß die intradermale Injektion von TNF-alpha Kontaktsensibilisierung verhindert, so wie dies nach UV-B Bestrahlung der Fall war (121).

(b) Migratorische Funktion

Aufgrund der relativ geringen Anzahl von T-Lymphozyten in der Haut resultiert ebendort eine naturgemäß niedrigere Wahrscheinlichkeit, daß LC mit exprimierten immunogenen MHC/Peptidkomplexen auf T-Zellen treffen, die spezifisch zu ihnen "passen", und somit in der Lage wären, Immunität zu induzieren. Deshalb scheint eine Migration aus der Haut via Lymphgefäße an einen Ort hoher T-Zelldichte sinnvoll. Dafür prädestiniert sind die lymphatischen Organe, welche den ankommenden LC bzw. DC ein riesiges Reservoir an T-Zellen bieten, aus welchen sie in der Folge jene mit den passenden TCR selektieren können. Dieses Konzept der "Sensibilisierung in lymphatischen Organen" stammt ursprünglich aus Experimenten mit Hauttransplantaten (122) und Kontaktsensibilisierung (123), welche zeigten, daß zur Erlangung von Immunität ein Intaktsein der afferenten Lymphgefäße unumgänglich notwendig ist.

Die Existenz eines solchen Wanderverhalten konnte durch die Arbeit von Larsen et al. (124) unmißverständlich nachgewiesen werden. Dies wurde durch zahlreiche weitere Publikationen bekräftigt (114,125-130). Die Annahme, daß dabei die Wanderung DC via afferente dermale Lymphgefäße erfolgen würde, wurde zwar angenommen, konnte aber bisher *nicht direkt* nachgewiesen werden.

Nicht ganz ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, daß niedermolekulare Haptene, wie sie in den meisten Migrationsstudien zum Einsatz kommen, auf direktem Wege passiv in den Lymphknoten gelangen und sich erst dort an DC binden.

Nicht zuletzt sollte erwähnt werden, daß diesselben immunologischen Effekte, wie sie durch ausgewanderte LC bewirkt werden, möglicherweise auch durch emigrierte "Dermale Dendritische Zellen" (9,38) zustande kommen können.

(c) Adjuvante Funktion

Im lymphatischen Organ angekommen, stehen die Antigen-beladenen DC vor der Aufgabe, für ihren MHC/Peptid-, bzw. MHC/Peptid/Haptenkomplex spezifische T-Zellen zu finden und diese in weiterer Folge zur Proliferation zu stimulieren bzw. deren Zytokinproduktion anzukurbeln. Um dies zu bewerkstelligen, müssen folgende 3 Bedingungen erfüllt werden:

1. Eine *antigen-unspezifische DC/T-Zell Aggregation ("clustering")* (75,89,90,131) ermöglicht es reifen (nicht jedoch unreifen) DC in einer stabilen, jedoch transienten Verbindung relativ "zwanglos" sehr viele T-Zellen

auf einen etwaigen, zu ihrem MHC/Peptidkomplex passenden TCR "abzutasten". Möglicherweise wird dieser Suchvorgang noch durch die stete Bewegung der sog. "veils" erleichtert bzw. beschleunigt. Auf welche molekulare Basis dieses "clustering" gründet, ist derzeit noch nicht bekannt. Wahrscheinlich aber spielt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle ("clustering molecules") im Rahmen des Maturationsvorganges eine wichtige Rolle (82,91,132,133).

2. Nach erfolgreicher Suche nach einem passenden TCR erfolgt nun als nächster Schritt die *antigenspezifische DC - T-Zell Bindung* zwischen MHC Klasse II/Peptidkomplex und dem spezifischen TCR.

Die große Menge von MHC Klasse I und II Molekülen auf der DC-Oberfläche (34,134) ermöglicht es denselben, ein weites Spektrum immunogener Peptide zu präsentieren. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zeigen, daß Antigen präsentierende Zellen eine limitierte Zahl von prädominanten immunogenen Peptiden präsentieren, sowie zusätzlich eine Vielzahl von Peptiden in großer Variation (135). Die Anzahl individueller MHC/Peptidkomplexe, welche notwendig ist, um eine T-Zelle zu stimulieren, ist relativ gering. Sie bewegt sich im Rahmen einiger hundert (104,105,136).

Zahlreiche "Molekülpaare", wie sie in *Tabelle 2* aufgeführt sind, medieren wahrscheinlich die DC/T-Zell Adhäsion und die Ingangsetzung stimulierender, interzellulärer Reaktionsabläufe. Sie können in einer *T-Zell unabhängigen* Art und Weise in relativ starkem Ausmaß (9,79,82) gleichzeitig exprimiert werden. Dies bewirkt einen deutlichen funktionellen Vorteil von DC gegenüber anderen Antigen-präsentierenden Zellen, wie beispielsweise B-LZ (105). Auch Zytokine, wie Interleukin-1beta (137,138) und Interleukin-12 (139,140) scheinen auf dieser Ebene maßgeblich beteiligt zu sein.

3. Für die T-Zell-Proliferation sind außerdem sog. *kostimulatorische Signale* notwendig, welche von DC ausgesandt werden (141). Diese Signale sind noch nicht vollständig identifiziert (142), für das *B7/BB1 (CD80)*-Molekül, welches auf reifen DC exprimiert wird (85,86,133), konnte eine kostimulatorische Funktion nachgewiesen werden (143-145). Dies gilt auch für das *B7-2 (CD86)* - Molekül (87,146-148).

Tabelle 2: Akzessorische Moleküle auf der LC-Oberfläche und Gegenpart auf der T-Zelle

<u>Langerhanszelle</u>	<u>T-Zelle</u>
ICAM-1(CD54)	LFA-1(CD11a)
ICAM-3(CD50)	"
B7-1(CD80)	CD28 & CTLA-4
B7-2(CD86)	"
Heat stable antigen	nicht bekannt
MHC Klasse -I	CD8
MHC Klasse-II	CD4
CD40	CD40 L

D. FRAGESTELLUNG

Die Fähigkeit von DC der Haut, diese verlassen zu können und über den Weg der afferenten Lymphe in Lymphknoten oder Milz zu gelangen, gilt als etabliertes Faktum. Trotz der Vielzahl erhobener Daten und der, in der Regel indirekt erbrachten Hinweise blieben viele Fragen bezüglich des Wanderungsverhaltens unbeantwortet. Insbesondere über die regulativen Mechanismen, aber auch über die Quantität und Qualität dieser Emigration ist noch relativ wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, das Migrationsverhalten *humaner* kutaner DC näher zu betrachten. Als Möglichkeit einer Annäherung an die Verhältnisse "*in vivo*" bot sich die Verwendung eines Organkultursystems an, welches, sieht man von einigen Modifikationen ab, von Larsen et al. (124) übernommen wurde. Folgende Fragen sollten untersucht werden:

(1) Ist das von Larsen et al. ursprünglich für das murine System etablierte Organkulturmodell auch für Untersuchungen im Humansystem geeignet?

Erfolgt eine Emigration von DC aus der Epidermis, und wenn ja, welche Aussagen lassen sich über die Quantität bzw. Qualität dieses Verhaltens treffen? Handelt es sich hierbei um ein "starres" Verhalten oder lassen sich interindividuelle Unterschiede erkennen?

(2) Was geschieht in der darunterliegenden Dermis? Kommt es hier zu einer Akkumulation der emigrierten LC? Gelingt es, die ausgewanderten LC in den Lymphgefäßen darzustellen und ist es möglich, im Rahmen dieser Untersuchung Hinweise auf die Rolle der sog. Dermalen Dendritischen Zellen zu erhalten?

(3) Welche Mechanismen steuern diese Emigration? Besteht die Möglichkeit, in diesen Prozeß derart einzugreifen, daß eine Stimulation oder Hemmung resultiert? Kann eine derartige Modulation nur über Zytokine erfolgen oder reichen dafür bereits einfache physikalische Maßnahmen aus? Welche Emigrationskinetik zeigen derart beeinflusste DC ?

(4) Läßt sich, bezugnehmend auf die Reifung von DC, während der Wanderung eine Veränderung wie z.B. Aufregulation bestimmter Adhäsionsmoleküle auf DC nachweisen?

(5) Wie lassen sich die emigrierten DC phänotypisch und funktionell charakterisieren?

II. MATERIAL & METHODIK

1. KULTURMEDIUM

In allen Experimenten wurde für die Organkultur als Kulturmedium *RPMI 1640* (*Seromed Biochrom, Berlin*) verwendet, welchem 10 %, bei 56°C 30 Minuten hitzeinaktiviertes Fötales Kälberserum (*FCS, Gibco, Paisley, Scotland*), 50 µM 2-Mercaptoethanol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO*), 20 µg/ml Gentamicin (*JRH Bioscience*) sowie 200 mM L-Glutamin (*Sebac, Stuben, A*) zugesetzt wurde. (Dieses Nährmedium wird in unserem Labor in Innsbruck kurz "**R 10**" genannt.)

2. PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

292 g NaCl sowie 69 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ wurden in 5000 ml *Acqua dest.* gelöst und der pH-Wert mittels 1 normaler HCl auf 6.9 eingestellt.

Für die experimentelle Verwendung wurde die so entstandene Stammlösung in der Folge 1 : 10 in *Acqua dest.* verdünnt.

3. PHOSPHATPUFFER

8.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 ml *Acqua dest.* gelöst. Diese 0.1 molare Lösung hat einen pH-Wert von etwa 9.2. Durch allmähliche Zugabe 0.1 m KH_2PO_4 (i.e. 6.8 g in 500 ml *Acqua dest.*) wird der pH schließlich auf 6.8 gedrückt. Ergebnis ist ein 0.1 m Na-K-Puffer mit pH 6.8.

4. 0.5-MOLARE AMMONIUMTHIOCYANAT-LÖSUNG (ATC-Lösung)

3.8 g Ammoniumthiocyanat (NH_4SCN , Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml 0.1 molarem Na-K-Puffer gelöst. pH ca. 6.4.

5. HUMANE HAUT

Ausgangspunkt sämtlicher Experimente waren Exzidate *gesunder humaner Haut*, die im Rahmen elektiver korrektiv-plastisch chirurgischer Maßnahmen anfielen und mir in freundlicher Weise von der Univ.-Klinik für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie Innsbruck sowie von der entsprechenden Abteilung am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Salzburg (OA Dr. Ludwig Hefel) zur Verfügung gestellt wurden.

Hauptquelle dieser Hautproben waren *Mammareduktionsplastiken*, vor allem des häufigeren Vorkommens wegen, aber auch aufgrund des Erhalts ausreichender Menge qualitativ akzeptabler Haut. Die kontinuierliche Verwendung gerade dieser Haut sollte zudem auch die Möglichkeit der "transversalen Vergleichbarkeit" der experimentell erhobenen Befunde eröffnen. In einigen Fällen wurde auf *abdominelle Hautpartien* zurückgegriffen, die von sogenannten "Fettschürzen-Operationen" stammten. Dies erwies sich insbesondere für größere Versuchsansätze als vorteilhaft.

Sämtliche OP-Präparate waren frei von subkutanem Fettgewebe. In Einzelfällen erhielt ich Spalthautpräparate mit einer Schnittdicke von ca. 0.2 mm.

In einigen Fällen waren auf der Hautoberfläche Reste von Farbstoff erkennbar (i.e. präoperative Schnittführungsmarkierung). Entsprechende Areale wurden im Hinblick auf potentielle Verfälschungen der Ergebnisse vorsorglich eliminiert.

Alle Präparate wurden baldmöglichst weiterverarbeitet. Dies geschah in 90 % der Fälle innerhalb der ersten Stunde nach Erhalt, in den restlichen Fällen bis zum Ablauf der zweiten Stunde. Für spezielle Fragestellungen wurde die "postoperative Liegezeit" aber auch fallweise beträchtlich prolongiert. Hierbei wurde die Haut bei 4°C gekühlt.

Das Alterspektrum der Patientinnen lag zwischen 15 und 53 Jahren. Alle waren zum Zeitpunkt der Operation gesund und wiesen keine dermatologischen Veränderungen im Operationsbereich auf.

6. ORGANKULTUR HUMANER HAUT

6.1. Vorbereitung der Haut

Mittels eines *Einwegdermatoms* (Daval-Simon, Bard Inc., Sockanosset, MA, Bezugsquelle: Delasco Dermatological Supplies, Council Bluffs, Iowa, U.S.) wurden unter sterilen Kautelen zunächst dünne Hautproben gewonnen (Dicke 0.2 - 0.3 mm), welche in weiterer Folge für etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem Cocktail aus

(1) 30 ml RPMI

(2) 300 µl Gentamycin (JRH, Bioscience), [Endkonzentration: 500 µg/ml, dies entspricht dem 10-fachen der üblichen Arbeitskonzentration]

(3) 770 µl eines 1-molaren HEPES Puffers

gewaschen wurden. Für diese Prozedur praktisch bewährt hat sich ein 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg). Sodann konnte die Haut mittels Skalpell in einer sterilen Petrischale in ca. 15 x 15 mm kleine Einzelstücke zerkleinert werden, worauf die Haut nun für die Organkultur vorbereitet war.

Anmerkungen zur Dermatom-Handhabung. Es sei hier darauf hingewiesen, daß unterschiedlicher Anpreßdruck des Dermatoms auf die Hautoberfläche naturgemäß analog dazu zu unterschiedlicher Dicke des dermalen Anteils der Hautprobe führt. Dies eröffnet dem Anwender einerseits Freiraum bei der Bewältigung spezieller Fragestellungen, kann aber andererseits zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen, insbesondere dann, wenn im Rahmen eines experimentellen Ansatzes Hautproben mit stark differierendem dermalen Anteil verwendet wurden. Näheres dazu siehe "Emigrationskinetik".

6.2. Organkultur

Als Kulturgefäß kam ein Doppelkammersystem (siehe Abbildung) zum Einsatz (24 mm Transwell™ porous cell culture insert; Tissue culture treated, 3.0 µm pore, polycarbonate membrane; Kat. Nr. 3414, Costar, Cambridge, MA).

15 x 15 mm kleine, vorbereitete Hautstücke wurden unter sterilen Bedingungen mit der dermalen Seite nach unten in Einsätze gelegt, deren Boden aus einer porösen Membran (Porendurchmesser 3 µm) besteht. Diese Einsätze konnten derart in die 6-well Platten eingesenkt werden, daß die Membran 1 mm über dem Boden des jeweiligen wells zu liegen kam. Darunter liegender Raum bleibt dem Kulturmedium vorbehalten, welches die Möglichkeit hat, durch die Poren zu diffundieren und die auf der Membran liegende Haut mit Nährstoffen zu versorgen. 1.8 ml Nährmedium / well erwies sich als optimal.

Wieviele "wells" mit Hautstücken belegt wurden ergab sich aus der Anzahl der gewünschten Entnahmezeitpunkte.

Zusammenfassend ergeben sich somit folgende Voraussetzungen:

Die dermale Seite der Haut bekommt Kontakt zum Nährmedium, die epidermale Seite liegt über Medium-Niveau und bleibt somit trocken.

Die Organkulturplatte wurde nach vollendetem Beladen mit einem Deckel verschlossen und bei 37°C und 5 % CO₂-Anteil inkubiert.

Maximal 24 Stunden nach Kulturbeginn war eine Erneuerung des Nährmediums obligatorisch.

Die Gesamtdauer der Organkultur betrug in den meisten Fällen 48 Stunden. In einigen Fällen wurde sie ausnahmsweise auf 72 Stunden erhöht, wobei hier ein zweiter Mediumwechsel nach 48 Stunden durchgeführt wurde.

Nach Ablauf von 24 bzw. 48 Stunden (*fixe Zeitpunkte*), sowie nach 6-8 bzw. 33-36 Stunden (*variable Zeitpunkte*) wurde jeweils 1 Membraneinsatz mit der darauf befindlichen Haut entnommen, welche nun mittels Skalpell in 3 Teile zerschnitten wurde. Hierbei entfielen auf Teil 1 und 2 jeweils ca. 1/6 der Gesamtfläche, auf Teil 3 2/3. *Teil 1* wurde nach kurzer Zwischenlagerung mit 5 % - Formalin Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Kontrollhistologie). *Teil 2* sollte Ausgangsmaterial für die spätere Anfertigung von Gefrierschnitten sein und wurde, in Alufolie verpackt, zunächst bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. *Teil 3* war für die der Herstellung epidermaler und dermaler "sheets" bestimmt und nahm deswegen den flächenmäßig größten Teil für sich in Anspruch. In aller Regel folgte die "sheet"-Herstellung unmittelbar nach Entnahme der Haut. Unter bestimmten Umständen kann diese Prozedur aber auch auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden. Die Haut wird hierfür einfach, wie oben beschrieben, tiefgefroren. Der *Sinn dieser Dreiteilung* sollte darin bestehen, nach der endgültigen Verarbeitung der Einzelstücke, zweidimensionale Einblicke in die Haut zu ganz bestimmten Zeitpunkten zu ermöglichen, um somit etwaige morphologische und immunphänotypische Veränderungen über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachten zu können. Als Referenz hierfür wurden Gefrierschnitte und "sheets" des Zeitpunktes "0-Stunden" herangezogen. Die fixen Zeitpunkte sollten zudem die Vergleichbarkeit von Operationspräparaten vieler unterschiedlicher Patientinnen ermöglichen.

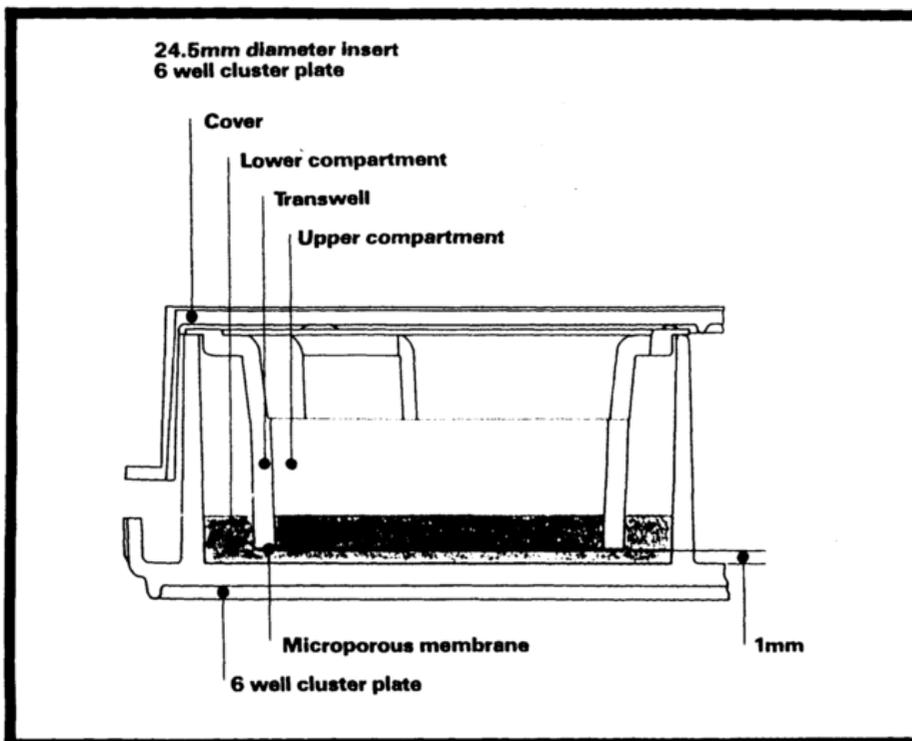


Abb.1. Schnitt durch das Doppelkammersystem des Organkulturgefäßes.

7. HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

Vorbemerkung. Wenn in dieser Arbeit von Gefrier-, bzw. Kryostatschnitten die Rede ist, so sind damit ausschließlich Schnitte in vertikaler Ebene, bezogen auf die Oberfläche der Haut, gemeint. Dies, obgleich jene strenge Verknüpfung von Begriffen nicht ganz korrekt ist. Da ich aber im Verlaufe meiner Arbeit eine spezielle Methode der Herstellung dermalen Transversalschnitte entwickelt habe, welche sich gleichfalls der Gefrierschnitttechnik bedient, die Schnittführungsebene hierbei jedoch eine horizontale ist, erscheint mir obige Differenzierung aus didaktischen Gründen vertretbar.

7.1. Beschichtete Objektträger

Um eine dauerhafte Haftung der Gefrierschnitte auf Objektträgern zu erreichen, ist es unumgänglich, diese vor der eigentlichen Schnittprozedur speziell zu beschichten. Objektträger der Maße 76 x 26 mm / 3 x 1 inch (Menzel, Germany) wurden deshalb mit *Poly-L-Lysine, Hydrobromid (Sigma Chemical Comp., Nr. P 6516)* behandelt. Dazu wurde eine zu 1 ml aliquotierte Stammlösung, welche Poly-L-Lysine in einer Konzentration von 5 mg/ml enthielt, mit *Acqua dest. 1 : 100* verdünnt und die Objektträger für etwa 30 Sekunden eingetaucht. Danach erfolgte eine Lufttrocknung bei Raumtemperatur über Nacht.

7.2. Gefrierschnitttechnik

Als Gefrierschnittmaschine (Kryostat) diente ein FRIGOCUT 2800 der Firma Reichert-Jung. Die Boxtemperatur betrug -26°C , die Objekttemperatur -24°C .

Bis dahin bei -20°C eingefrorene Hautstücke wurden zunächst kurz angetaut und dann unter Zugabe einiger Tropfen PBS zwischen 2 unbeschichteten Objektträgern (76 x 26 mm / 3 x 1 inch) erneut eingefroren. Die Idee zu diesem kleinen *Trick* entstand, als ich zu wiederholtem Male an fertig immunhistochemisch gefärbten Gefrierschnitten feststellen mußte, daß die Epidermis abschnittsweise verdickt erschien und ihren charakteristischen Schichtenbau vermissen ließ. Es handelte sich dabei um ein Schneideartefakt, das dadurch zustande kam, daß bedingt durch feine Fältelung der Haut, die Epidermis beim Schneidevorgang immer wieder schräg getroffen wurde. Gerade dies war aber für meine Fragestellung ungeeignet. Ziel des oben erwähnten Tricks sollte sein, ein absolut planes Hautstück und somit eine faltenlose Epidermis zu erhalten.

Um eine präzise vertikale Schnittführung durch die Haut zu bekommen, war es zumindest genauso wichtig, obiges planes Hautstück in weiterer Folge mit einer Pinzette derart aufzublocken, daß zwischen Haut und Schneidetischchen ein rechter Winkel entstand.

Nun konnten die $8.0\ \mu\text{m}$ dünnen Schnitte angefertigt und auf die bereits vorbereiteten Objektträger aufgebracht werden.

Dem schloß sich ein Trockenvorgang von 60 Minuten bei Raumtemperatur an, gefolgt von erneutem Einfrieren bei -20°C bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung oder einer sofortigen Färbung.

8. INDIREKTE IMMUNPEROXIDASEFÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

8.1. Vorbereitung

Einer *1-stündigen Trockenzeit bei Raumtemperatur* von Präparaten, die bei -20°C eingefroren waren bzw. der doppelten Zeit bei "frischen" Gefrierschnitten, folgte eine Fixierung *in reinem Aceton für die Dauer von 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur*. Anschließend wurden sämtliche Präparate nochmals *20 Minuten getrocknet*. Eine Umrandung der Schnitte mit einem *speziellen Fettstift (PAP-PEN, Daigo Sangyo, Japan)* hatte die Aufgabe, Antikörper-, bzw. Waschlösungen an Ort und Stelle über dem Schnitt zu halten bzw. deren Zerfließen zu verhindern.

8.2. Färbesequenz

Primärantikörper

Je nach Anzahl der Gefrierschnitte/Objektträger wurden zwischen 20 und 80 μl des entsprechend ausgewählten Antikörpers auf die Schnitte aufpipettiert. Es handelte sich entweder um konzentrierte, gereinigte Antikörper, welche zuvor in PBS/1% BSA (Bovines Serumalbumin, Fraction V, Serva-Feinbiochemica, Heidelberg) verdünnt wurden, oder aber um sogenannte "Sups" (= Supernatanten), i.e. Kulturüberstände von Antikörper-produzierenden Hybridomzellen. Diese kamen unverdünnt zum Einsatz. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Präparate bei 37°C in einer "feuchten Kammer" (Austrocknungsschutz).

Spülen 1

Im Anschluß an die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ein etwa 30 minütiger Waschvorgang in PBS ohne BSA. Die Objektträger wurden dazu in den Einsatz einer Küvette eingehängt und anschließend in den Puffer getaucht

Anmerkung. Um einerseits die Effizienz der Abspülung des Primärantikörpers zu erhöhen und andererseits die Waschzeit zu verkürzen, erschien mir die Durchführung des Spülvorganges auf einem Schütteltisch sinnvoll (Forciertes Spülen).

Sekundärantikörper

Verwendet wurden hierfür, je nach Herkunft des Primärantikörpers (Maus oder Ratte), entsprechende biotinylierte spezies-spezifische ganze Antikörper vom Schaf (Amersham, UK, Kat. Nr.1001,1004). Die Arbeitsverdünnung betrug in allen Fällen 1 : 200. Dies erreichte man automatisch durch Zugabe von 5 μl Antikörper-Lösung zu einem Gemisch aus:

(a) 795 μl PBS/1% BSA

(b) 100 μl 2-molare beta-D-Glucoselösung

(c) 100 μl Glucoseoxidase [15 U/ml]

In diesem Arbeitsschritt wurden zudem die "endogenen Peroxidasen" geblockt.

Menge der AK-Lösung sowie Inkubationsbedingungen wie oben beschrieben.

Spülen 2

Tertiärreagens

10 μl eines Streptavidin-biotinylierten Peroxidase-Komplexes (Amersham, UK, Kat. Nr. 1051) wurden in 990 μl PBS/1%BSA 1 : 100 verdünnt und auf die Schnitte aufgebracht. Menge der AK-Lösung und Inkubationsbedingungen wie oben beschrieben.

Spülen 3

Visualisation des Peroxidase-Konjugates

5 ml Natriumacetat-Puffer wurden zunächst 250 μl "AEC-Lösung" (i.e. 4 mg AEC 3-Amino-9-Ethylcarbarol, Sigma, in 1ml Dimethylformamid) zugesetzt, daraufhin filtriert und gut vermischt (Vortexer).

Die Zugabe von 10 μl 30 % Perhydrol (Merck, Darmstadt) bewirkt schließlich die Inangangsetzung der chemischen Reaktion. 50 - 70 μl dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger pipettiert und dort für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Es folgten zuerst eine *20 minütige Spülung in PBS, gefolgt von einer weiteren in Acqua dest. (10 Minuten).*

Gegenfärbung der Kerne

Normalfiltrierte Hämatoxylin-Lösung nach Papanicolao (Merck, Kat. Nr. 9253) wurde in einer Küvette gesammelt und die Objektträger mit den Gefrierschnitten für die Dauer von ca. 5 Sekunden darin eingetaucht. Beendet wurde die Gegenfärbung mit dem "Bläuen" der Präparate in Küvetten mit warmem Wasser.

Anmerkung. Einwirken des Farbstoffes länger als 6 Sekunden führt zu einem übersteigerten Färbefekt, was sich v.a. in der Epidermis in einem geringer werdenden Kontrast zwischen den Kernen der Keratinozyten und den immunhistochemisch detektierten Zielstrukturen widerspiegelt. Auch die photographische Dokumentation verliert rasch an Qualität.

Eindecken

Verwendet wurde 56°C warme Kaiser-Glyceringelatine für die Mikroskopie (Merck)

Lagerung der Präparate

Im Kühlschrank bei 4°C.

9. HERSTELLUNG EPIDERMALER SHEETS UND GEWINNUNG VON DERMIS

Die der Organkultur zu einem definierten Zeitpunkt entnommenen Hautstücke wurden zunächst mittels zweier feiner Pinzetten zum *Aufschwimmen auf eine 0.5-molare Ammoniumthiocyanatlösung* gebracht, wobei die dermale Seite nach unten gerichtet war. Diese Prozedur erwies sich regelmäßig als problematisch. Dies deshalb, weil die kleinen Hautstücke dazu neigten, sich randständig einzurollen und somit Teile der Epidermis unter die Flüssigkeitsoberfläche zu ziehen. Weitgehend gelöst werden konnte diese Schwierigkeit dadurch, daß die Hautstückchen vor dem Aufschwimmen sorgfältig in einem Papiertuch trockengetupft wurden, was bewirkte, daß sich die Stücke problemlos der Oberflächenspannung der Flüssigkeit anschmiegen und gleichmäßig aufschwammen.

Es folgte eine Inkubationsphase bei 37°C für 45 - 60 Minuten.

Anmerkung. Kürzere Inkubationszeiten von etwa 25 - 30 Minuten, wie von Juhlin & Shelley in den Acta Dermatovener. 57:289-296, 1977 vorgeschlagen, erwiesen sich häufig als zu kurz, um eine akkurate und leichtgängige Trennung von Epidermis und Dermis zu ermöglichen.

Variable Dicken dermalen Anteile nach Dermatombehandlung erforderten variable Inkubationszeiten. Je dicker, desto länger.

Nach Inkubationsende wurden die Hautstücke auf eine Glasplatte transferiert, die vorher mit PBS ohne BSA befeuchtet worden war. Hier erfolgte nun unter Verwendung zweier feiner gebogener Pinzetten die behutsame kontinuierliche Ablösung der Epidermis, die sich daraufhin auf dem PBS-Puffer problemlos eben ausbreiten ließ. Mit einem Skalpell wurde dann die Epidermis in *etwa 3 x 3 mm* kleine "epidermale sheets" zerkleinert.

Diese fixierte man gemeinsam mit der unzerschnittenen Dermis 20 Minuten in reinem Aceton in einer Glas-Petrischale.

Den Abschluß bildeten eine 20 minütige Waschung der "sheets" in PBS ohne BSA sowie in der Folge jeweils 2 ebenfalls 20 minütige Waschungen in PBS/1%BSA.

Nun konnten die fertigen "sheets" sowie die Dermis in Alufolie verpackt, bei -196°C schockgefroren und bei -20°C dauergelagert werden.

Anmerkungen zur Qualitätssicherung.

1. Es besteht die Möglichkeit, daß während des Trennens von Epidermis und Dermis basale epidermale Anteile auf der Dermis zurückbleiben, was zunächst unbemerkt bleiben kann. Dieses Artefakt führt jedoch zu einer maßgeblichen Qualitätsminderung immunhistochemisch gefärbter epidermaler "sheets".

Bei mikroskopischer Betrachtung stellen sich scheinbar "Langerhanszell-arme bzw. freie Areale" dar, ohne daß die Homogenität der Epidermis gestört erscheint. Erliegt man diesem Eindruck, so sind gravierende Fehler bei der Befundung vorprogrammiert. Um dem zu entgehen, empfiehlt sich folgendes Vorgehen: Man legt dazu ein Blatt dunkelblaues Papier unter jene Glaspetrischale, auf welcher man die Trennung bzw. das Zerkleinern der Epidermis zu "sheets" bewerkstelligt. Werden die "sheets" in der Folge von oben mit Licht bestrahlt, so lassen sich "Dichte-Inhomogenitäten" bei jenen erkennen, welche basaler Schichten entbehren. Diese "sheets" werden verworfen. Da nicht alle Inhomogenitäten auf fehlenden basalen Schichten beruhen, sind stets die "homogensten sheets" als Vergleich heranzuziehen. Zudem gilt bei der Entscheidungsfindung: *In dubio pro re.*

2. Sollten trotz obiger Vorgangsweise weitere Mängel auftreten, so ist es durchaus nicht zum Schaden der "sheets", die Konzentration von Ammoniumthiocyanat von 3.8 g je nach Bedarf auf bis zu 6 g /100 ml A.dest. zu erhöhen, was das Trennen von Epidermis und Dermis erleichtert. Diese Maßnahme ist im übrigen besonders dann empfehlenswert, wenn der dermale Anteil nach Dermatombehandlung etwas dicker ausgefallen ist.

Alternative Methode

Für spezielle Fragestellungen ist es wünschenswert, eine Trennung von Epidermis und Dermis unter sterilen Kautelen "ante culturam" durchzuführen. Da Ammoniumthiocyanat infolge seiner Zytotoxizität hierfür ungeeignet ist, erwies sich folgende Methode als besonders geeignet:

5 ml RPMI (Seromed Biochrom, Berlin) und 5 ml Dispase Typ II (Boehringer), [Endkonzentration 1.2 U/ml], eine neutrale Protease bakterieller Provenienz wurden in eine Petrischale pipettiert und die der Organkultur entnommenen Hautstücke darauf zum Aufschwimmen gebracht (siehe oben).

Nach 50 - 60 minütiger Inkubation bei 37°C konnte, wie weiter oben ausgeführt, die Epidermis abgelöst werden.

10. INDIREKTE IMMUN-PEROXIDASE/FLUORESZENZ-FÄRBUNG EPIDERMALER SHEETS

Primärantikörper

In verschließbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden jeweils 3 x 3 mm kleine epidermale "sheets" in 50 µl eines entsprechend verdünnten Antikörpers respektive unverdünnten Hybridom-Überstände für mindestens 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Waschen 1

Im Anschluß an jeden Inkubationsschritt wurden die "sheets" 3 x 15 min in PBS/1%BSA von ungebundenen AK gereinigt. Dieser Schritt erfolgte in 24-well-Platten auf einem Schüttler.

Sekundärantikörper

Biotinylierte Antikörper vom Schaf (Amersham), dem Primärantikörper entsprechend, gegen Maus, Ratte oder Kaninchen gerichtet.

Die gängige Arbeitsverdünnung betrug 1 : 200 (in PBS/1%BSA).

50 µl per Eppendorf.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C und erstreckte sich über 90 Minuten.

Waschen 2

Entsprechend wie in Waschen 1.

Tertiärreagens

50 µl /Eppendorf eines *Streptavidin-Peroxidase Komplexes* (Amersham), 1 : 100 verdünnt, oder aber eines *Fluoreszenz markierten Antikörpers* (*Fluorescein-isothiocyanat*, Texas-Red), 1 : 300 bzw. 1 : 50 verdünnt. Die *Inkubationsbedingungen* waren ident mit jenen unter "Sekundärantikörper".

Waschen 3

Wie oben.

Einbetten nach Wahl eines Fluoreszenz-gekoppelten AK

Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurden die "sheets" mit der *dermalen Seite nach oben* auf einen Objektträger plaziert und in *Vectashield Mounting Medium* (Vector Lab., Burlingame, CA) eingebettet.

Visualisation der Peroxidasereaktion

10 mg *Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid* (Polysciences Inc., Warrington, PA) wurden in 20 ml *Tris-HCl-Puffer* (pH 7.6) gelöst, *normalfiltriert* und in weiterer Folge mit 5 µl *Perhydrol 30 %* (Merck, Darmstadt) versetzt (auf gute Durchmischung achten). In 24 well-Platten, in denen sich *per well 500 µl* obiger Lösung befanden, wurden die "sheets" 10 Minuten bei *Raumtemperatur inkubiert*.

Ein 20 Minuten dauernder *Waschvorgang in reinem Tris-HCl-Puffer* schloß diesen Arbeitsschritt ab.

Einbetten der "Peroxidase-sheets"

Wie oben.

11. EINE NEUE METHODE DER SEQUENTIELLEN DERMIS-AUFBEREITUNG ALS GRUNDLAGE FÜR DIE HERSTELLUNG "HUMANER DERMALER SHEETS"

11.1. Einleitende Vorbemerkungen

Die mikroskopische Exploration dermalen "sheets" hinsichtlich der Darstellbarkeit und Auffindbarkeit gesuchter immunphänotypischer Merkmale erwies sich seit jeher als problematisch. Verantwortlich dafür war in erster Linie die relative "Dicke" dermalen "sheets", welche die Möglichkeiten der Durchlichtmikroskopie mitunter erschöpften.

Selbst die dünne Ohrhaut von Mäusen, Lieblingsobjekt der Begierde muriner Langerhanszell-Forschung, besitzt noch eine beachtlich "dicke" Dermis. Die hierbei die gesamte Dermis umfassenden "sheets" erfordern schon gewisse Kompromisse bei Betrachtung und photographischer Dokumentation, erlauben aber im wesentlichen die von der Epidermis abgetrennte Dermis *direkt* als sog. "dermales sheet" zu verwenden und immunhistochemisch auszuwerten.

Gänzlich anders stellt sich die Situation bei Humanhaut dar. Hier ist der Einsatz eines Dermatons unumgänglich um, nebst der Schaffung optimaler Voraussetzungen für die Organkultur, bei der Dermis-Dicke in einen überhaupt "mikroskopierbaren" Bereich zu gelangen. Und selbst dann variieren die Dicken des dermalen Anteils beträchtlich. Es ist zwar prinzipiell auf diese Art und Weise möglich, sehr dünne dermale "sheets" zu gewinnen, jedoch ist dies erstens nicht die Regel und zweitens nimmt man damit

bewußt in Kauf, nicht wie bei der Maus die gesamte Dermis, sondern eben nur den gerade obersten Teil für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben.

Zu der Problematik des Mikroskopierens gesellt sich im übrigen eine nicht minder bedeutende, grundlegende Schwierigkeit, nämlich jene der, mit zunehmender Dermis Dicke inhibierten Antikörperpenetration.

All diese Einflüsse erschwerten respektive verhinderten letztendlich, sich ein Gesamtbild über die Verhältnisse in der *humanen* Dermis zu schaffen. Ich entschloß mich also zu einem neuen Lösungsansatz.

11.2. Prämissen

Oberstes Ziel war in erster Linie die Verringerung der Dicke der zu explorierenden dermalen Strukturen. Da diese neue Methode primär für den Nachweis dendritischer Zellen in afferenten dermalen Lymphgefäßen konzipiert wurde und anzunehmen war, daß diese in den meisten Fällen nicht parallel zur Hautoberfläche verlaufen, konnte die Dicke der Dermis nicht bedingungslos verringert werden. Es war im besonderen Bedacht auf die Tatsache zu nehmen, daß die lymphatischen Gefäße, wenn auch nur über kürzere Strecken, mikroskopisch in ihrem Verlauf verfolgbar sein sollten. Hierfür war ein "goldener Mittelweg", ein Kompromiß vonnöten. Die Vorteile einer möglichst geringen Dermisdicke, wie optimale Antikörperpenetranz, Transparenz und luzide Darstellung immunphänotypischer Charakteristika durften also nicht nur aus Rücksicht auf Lymphgefäßverlauf und Überblick nicht ausgereizt werden, sondern auch um der sich immer schwieriger gestaltenden praktischen Handhabung hauchdünner dermalen Präparate willen.

In mehreren Pilotversuchen zeigte sich sehr bald, daß obigen Ansprüchen dann am besten entsprochen wird, wenn die Dicke der zu untersuchenden Dermis zwischen 50 und 80 µm liegt.

11.3. Prinzip

Etwa 15 x 15 mm große Dermisstücke, wie sie nach Entnahme aus der Organkultur und nach Ablösung der Epidermis vorlagen, sollten unter Anwendung der Gefrierschnittechnik von der, der Subkutis zugewandten Seite in Richtung Epidermis, sequentiell in zwischen 50 und 80 µm dünne, zur Hautoberfläche parallele "Dermis-Transversalschnitte" aufgearbeitet werden.

11.4. Ergebnis

- (1) *Optimale Antikörperpenetration*
- (2) *Gute Darstellbarkeit immunhistochemisch gefärbter Strukturen*
- (3) *Einfachere mikroskopische Auswertbarkeit*
- (4) *Bessere Orientierung über die "Tiefe" der Zielstrukturen in der Dermis*
- (5) *Trotz Zerlegung der Dermis in mehrere "sheets", Möglichkeit der mentalen Integration sämtlicher Partialbefunde*
- (6) *Standardisierung der "sheet"- Dicke schafft günstigere Voraussetzungen für die "transversale Vergleichbarkeit" von verschiedenen Dermis-Präparaten i.e. sowohl Dermis einer Patientin zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten, als auch Dermis verschiedener Patientinnen.*

11.5. Technik

Arbeitsgerät und prinzipielle Einstellungen entsprachen denselben, wie sie unter "Herstellung von Gefrierschnitten" bereits erwähnt wurden.

VORBEREITUNG

Zunächst wurde ein großer Tropfen PBS, dessen Durchmesser etwa 2 cm betrug, auf einem Objektstüchchen eingefroren, welches anschließend in die Schneidevorrichtung eingespannt werden konnte. Nun erfolgte ein "Anschneiden" dieses PBS-Blockes mit rascher Messergeschwindigkeit. Dies wurde so oft wiederholt, bis die angeschnittene Fläche jene des Dermis-Präparates um etwa ein Drittel überstieg.

Anmerkung. Dieser Arbeitsschritt schafft die Voraussetzung dafür, daß die Schnittebene eine parallele zu jener der Hautoberfläche ist. Denn nur so ist gewährleistet, daß die später geschnittenen dermalen "sheets" über ihre gesamte Ausdehnung Strukturen gleicher "Tiefe" beinhalten. Im Gegensatz dazu resultiert aus einer Abweichung der Schnittebene aus der horizontalen eine gleichzeitige Darstellung von verschiedenen tief in der Dermis eingebetteter Strukturen, was Verfälschungen in der Beurteilung der flächenhaften Verteilung derselben nach sich ziehen kann.

EINBETTEN DER DERMIS

Das bis dahin tiefgefrorene Dermis-Stück (ca. 15 x 15 mm) wird aufgetaut, kurz in PBS getaucht und dann mit der, der Epidermis zugewandten Seite auf den angeschnittenen PBS-Block transferiert.

Anmerkung. Bei diesem Transfer-Schritt ist etwas Übung erforderlich, da er sehr rasch (nahezu sofortiges Festfrieren der Dermis, in welcher Position auch immer...) und präzise erfolgen muß. Es ist nämlich einerseits auf ein gleichmäßiges Aufliegen der Dermis zu achten, wobei aber andererseits der dabei ausgeübte Druck möglichst gering und vor allem einigermaßen gleichmäßig sein sollte. Denn lokale "Druck-Spitzen" bewirken eine Verdichtung des Gewebes, was letztendlich dazu führen kann, daß sich, wie schon erwähnt, Strukturen auf einem dermalen "sheet" zur Darstellung kommen, die bezogen auf die jeweilige "sheet"-Dicke (z.B. 60 µm), dort eigentlich nicht zu finden wären, da sie in Wirklichkeit tiefer (z.B. 70 µm) liegen.

In weiterer Folge wurde das Dermisstück bis zur vollständigen Einbettung mit PBS beträufelt.

SCHNEIDEN

Zunächst erfolgte ein *Anschneiden des Präparates*, das solange fortgeführt wurde, bis sämtliche, durch die Dermatom-Behandlung bedingten Unebenheiten an der "Unterseite" des Dermisstückes abgehobelt waren und die gesamte Dermis gleichmäßig vom Messer erfaßt wurde. Dann konnte man die gewünschte Dicke der "sheets" einstellen und nach Wahl einer *moderaten Messergeschwindigkeit* (i.e. etwa 30-40% der Maximalen) einen "Dermis-Transversalschnitt" nach dem anderen gewinnen, bis die gesamte Dermis verbraucht war.

LAGERUNG

Nach jedem Schnitt wurde das jeweilige dermale "sheet" in noch tiefgefrorenem Zustand mittels einer feinen Pinzette auf einen unbeschichteten Objekträger aus Glas transferiert. Nachfolgende "sheets" wurden daneben plaziert. War die Serie komplett, erfolgte die Abdeckung mit einem zweiten Objekträger. Auf diesem konnte nun leicht eine Kennzeichnung erfolgen, die erkennen lassen sollte, welche Position das jeweilige "sheet" innerhalb der Schnittserie einnahm. Dies wiederum ließ Rückschlüsse auf die ursprüngliche Lokalisation in der Dermis zu.

Die Wahl der Lagerung auf Glas war keineswegs Zufall, sondern hatte vielmehr ihren Sinn darin, als Unterlage für das Zerschneiden der doch noch relativ großen "sheets" (Reserve) in etwa 3 x 3 mm kleine, wie sie für die Immunhistochemie notwendig waren. Zudem war auf diese Art und Weise kein neuerliches Verbringen der "sheets" auf eine geeignete Unterlage vonnöten, sodaß sich die qualitätsmindernden

Manipulationen an den ohnehin empfindlichen "sheets" auf ein Mindestmaß beschränkten. Jenes "Sandwich" aus Objektträgern und Dermis wurde schlußendlich mit Alufolie umwickelt, bei -196°C schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

11.6. Immunhistochemie "Dermaler Transversalschnitte"

Die auf 3 x 3 mm Größe getrimmten Transversalschnitte wurden "schwimmend" einer immunhistochemischen Färbung zugeführt, wie sie schon im Kapitel "Färbung epidermaler "sheets" näher erläutert wurde.

Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte in kleinen Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die Waschvorgänge gelangen am besten in 24-well Kulturplatten. Einbettmedium war Vectashield Mounting Medium.

12. HERSTELLUNG UND FÄRBUNG VON ZYTOZENTRIFUGENPRÄPARATEN

In Einzelfällen wurden die, im Rahmen der Organkultur in das Nährmedium emigrierten dendritischen Zellen geerntet, um zwecks immunphänotypischer Charakterisierung Zytopräparate herzustellen. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

12.1. Ernten der Zellen

Zunächst wurde das Nährmedium sämtlicher "wells" sorgfältig, unter mehrmaligem Ausspülen mit "R10" aufpipettiert und gesammelt. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren der Zellsuspension über 8 Minuten, bei 4°C sowie 1500 Umdrehungen pro Minute. Dann wurde der "Überstand" vorsichtig abgesaugt und das verbliebene "pellet" in einer geringen Menge "R 10" resuspendiert. Es folgte die hämozytometrische Ermittlung der Zahl emigrierter Zellen.

12.2. Herstellung der Zytozentrifugenpräparate

Je 200 µl Zellsuspension, welche 30 - 40 000 Zellen enthalten sollten (dies konnte durch eventuelle Verdünnung realisiert werden), wurden auf unbeschichtete Objektträger zentrifugiert. Dies geschah bei 4500 Umdrehungen pro Minute über einen Zeitraum von 6 Minuten (Zytospin 2, Shandon). Im Anschluß an die Herstellung mußten die Zytospins über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

12.3. Immunhistochemie von Zytopräparaten

VORBEREITUNG

Aufgetaute Präparate wurden *1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend 5 Minuten in Aceton fixiert und nochmals 20 Minuten getrocknet.*

Um ein Zerfließen der Antikörper-, bzw. Waschlösungen zu verhindern, erfolgte eine Umrandung der Zellen mit einem speziellen Fettstift (PAP-Pen).

FÄRBESEQUENZ/IMMUNFLUORESZENZ

1. Inkubation mit dem *Primärantikörper*.

Pro Objektträger wurden 50 - 60 µl Antikörperlösung aufpipettiert.

Die Inkubation erfolgte in einer sog. "feuchten Kammer" bei 37°C über 30 Minuten.

2. Waschen mit PBS/1%BSA

Hierfür wurde nach Absaugen der Antikörperlösung der Puffer mit einer Pasteurpipette aufgetropft und kurz darauf wieder abgesaugt. Dieser Vorgang erfolgt etwa fünf Mal in Folge.

3. Inkubation mit dem Sekundärantikörper.

Durchführung wie in 1.

4. Waschen in PBS/1%BSA

Durchführung wie in 2.

5. Inkubation mit dem Tertiärreagens

Durchführung wie in 1.

6. Einbetten in Vectashield Mounting Medium.

13. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Der Organkultur entnommene humane Vollhautpräparate wurden zunächst in PBS gewaschen und hierauf nach Standardmethoden fixiert (Formaldehyd-Glutaraldehyd Fixans nach Karnovsky, Osmium), kontrastiert (Uranylacetat), entwässert und in Epon eingebettet (107).

Die Befundung der "Ultradünnschnitte" erfolgte am Philips Elektronenmikroskop EM 400 (Philips, Eindhoven, Niederlande).

14. MIKROSKOPISCHE BEFUNDUNG UND AUSWERTUNG

14.1. Phasenkontrastmikroskopie

Mittels eines NIKON Invert-Mikroskops Diaphot TMD erfolgte regelmäßig die Überwachung der Organkultur im Hinblick auf mikrobiologische Kontamination und Emigration dendritischer Zellen.

14.2. Durchlichtmikroskopie

Sie diente in erster Linie der Auswertung sämtlicher, nach der indirekten Immunperoxidase gefärbten Präparaten, i.e. epidermale "sheets" und Gefrierschnitte.

In Einzelfällen wurden auch "Dermis-Transversalschnitte" beobachtet, die i.R. eines Pilotversuchs mit obiger Technik behandelt waren. Verwendung fand ein OLYMPUS BH2 BHS DL-Mikroskop.

14.3. Immunfluoreszenzmikroskopie

Hierfür stand ein Forschungsmikroskop ORTHOPLAN II, Leitz, Wetzlar, Germany, in Verbindung mit einer Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung und einem Leitz Vario Orthomat (Mikrophotographie-Einrichtung) zur Verfügung.

Es diente vor allem der semiquantitativ-deskriptiven Auswertung von "Dermis-Transversalschnitten", leistete aber auch bei der Beurteilung epidermaler "sheets" sowie Zytozentrifugenpräparaten gute Dienste.

14.4. Ermitteln der Langerhanszellidichte in der Epidermis

Dies erfolgte durch randomisiertes Auszählen von mindestens 20 Zählfeldern pro epidermalem "sheet" bei einer vierzig-fachen Objektivvergrößerung. Das dabei benutzte Zählfeld war optisch im Okular integriert und zuvor mit einem Objektmikrometer kalibriert worden.

14.5. Photographische Dokumentation

IMMUNPEROXIDASE

Als Filmmaterial diente in allen Fällen "Ektachrome 160 T 36 Kunstlicht 35 mm" (KODAK). Die Belichtungszeitbemessung erfolgte automatisch.

IMMUNFLUORESZENZ

Bei identem Filmmaterial erfolgte hier die Wahl der Belichtungszeit manuell. Gerade bei Dokumentationen im Bereich der "Dermis-Transversalschnitte" spiegelten sich empirisch gewonnene Erkenntnisse in z.T. stark variierenden Belichtungszeiten (2 - 8 Minuten) wider.

15. TABELLE 3 : ÜBERSICHT ÜBER SÄMTLICHE VERWENDETE ANTIKÖRPER

15.1. PRIMÄRANTIKÖRPER

Spezifität	Klon/Name	Ig-Klasse	Quelle	Referenz
CD1a	OKT-6/CRL8020	Maus IgG1	ATCC ¹	
CD1a-FITC	OKT-6	Maus IgG1	Ortho ²	
HLA-DR	L243/HB55	Maus IgG2a	ATCC	
HLA-DR-FITC	L243	Maus IgG2a	BDIS ³	
HLA-DR-DQ	9.3F10/HB180	Maus IgG2a	R. Steinman ⁴	
Birbeck Granula	LAG	Maus IgG1	M. Kashihara ⁵	(149)
CD80/B7-BB1	L.307.4	Maus IgG1	BDIS	
CD86/B7-2	IT2.2	Maus IgG2b	Pharmingen ⁶	(150)
CD83	HB-15a	Maus IgG2b	T. F. Tedder ⁷	(151)
CD54/ICAM-1	R6.1	Maus IgG2a	Bender ⁸	
CD44, standard		Maus IgG1	P. Herrlich ⁹	
CD44, 4v		Maus IgG2a	P. Herrlich ⁹	
6v		Maus IgG2a		
9v		Maus IgG1		
E-Cadherin	HECD-1	Maus IgG1	Takara ¹⁰	
VLA-4a	HP2/1	Maus Ig	Pals ¹¹	
CLA	HECA-452	Ratte IgM	Duijvestijn ¹²	(152)
ELAM-1	2G7	Maus IgG1	Otsuka ¹³	
CD40	G-28-5	Maus IgG1	J. Ledbetter ¹⁴	
FactorVIIIr-Ag	polyklonal	Kaninchen Ig	DAKO ¹⁵	
Gefäßendothel	PAL-E	Maus Ig	Seralab ¹⁶	(153)
CD1b	NUT2	Maus IgG1	E. Berti ¹⁷	
CD1c	L161	Maus IgG1	E. Berti ¹⁷	
CD40-Ligand	TRAP-1	Maus IgG1	R. Kroczeck ¹⁸	(154)
CD19	Leu -12	Maus IgG1	BDIS	
CD14	Leu -M3	Maus IgG2b	BDIS	
Kontroll-IgG2a		Maus IgG2a	BDIS	
Kontroll-Ig G1	α-DNP	Maus IgG1	ATCC	
Kontroll-IgG2b	TIB93	Maus IgG2b	ATCC	
Kontroll-IgM	TIB99	Maus IgM	ATCC	
Kontroll-IgM	MAC-3	Ratte IgM	ATCC	

Legende zu Tabelle 3 / A.

- (1) American Type Culture Collection, Rockville, MD
- (2) Ortho, Raritan, NJ
- (3) Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA
- (4) The Rockefeller University, New York, NY
- (5) Department of Dermatology, Kyoto University, Kyoto, Japan
- (6) Pharmingen, San Diego, CA
- (7) Duke University, Durham, NC
- (8) Bender Immunsysteme, Wien, Österreich
- (9) Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
- (10) Takara Inc., Otsu, Japan

- (11) Academisch Ziekenhuis, Vrije Universiteit, Amsterdam, Niederlande
- (12) Univesity of Limburg, Maastricht, Niederlande
- (13) Otsuka America Pharmaceuticals, Rockville, MD
- (14) University of Washington, Seattle, WA
- (15) DAKO, Glostrup, DK
- (16) Seralab, Crawley Down, UK
- (17) Department of Dermatology, University of Milano, Italy
- (18) Robert Koch - Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin

15.2. SEKUNDÄRANTIKÖRPER

In Abhängigkeit des verwendeten Primärantikörpers kamen folgende Sekundärantikörper zum Einsatz:

- (1) Schaf-*anti-Maus* Ig, biotinyliert, spezies-spezifisch, ganzer Antikörper (Nr.1001)
- (2) Schaf-*anti-Ratte* Ig, biotinyliert, spezies-spezifisch, ganzer Antikörper (Nr.1002)
- (3) Esel-*anti-Kaninchen* Ig, biotinyliert, spezies-spezifisch, ganzer Antikörper (Nr.1004)
(alle von Amersham int., Amersham, UK)

15.3. TERTIÄR-REAGENZIIEN

- (1) Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex (Nr.1051)
- (2) Streptavidin Fluoresceinisothiocyanat [FITC] (Nr.1232)
- (3) Streptavidin Texas Red (Nr.1233)
(ebenfalls alle von Amersham, UK)

III. ERGEBNISSE

A. LANGERHANSZELLEN VERLASSEN DIE EPIDERMIS WÄHREND DER ORGANKULTUR

1. Der Gefrierschnitt - Simultane Beurteilung von Epidermis und Dermis

Ein *erster* Zugang zur punktuellen Erfassung von Dichte und Verteilung epidermaler DC i.e. Langerhanszellen, sowie deren (Wanderungs-) Verhalten während 48 Stunden Organkultur erfolgte mittels immunhistochemischer Methoden (sensitive 3-Stufen Technik). Die Herstellung von Längsschnitten durch die Haut mittels Kryostat ermöglichte eine gleichzeitige Beurteilung sowohl der Epidermis als auch der Dermis: Hierbei lag das Augenmerk mehr auf der Beobachtung bestimmter immunphänotypischer Marker sowie deren Intensität und Ausprägung, denn auf einer genauen quantitativen Erfassung. Diesen Richtlinien folgend, geschah dies für Haut zum Zeitpunkt "Null Stunden" (entspricht der frischen Haut), "24 Stunden" sowie "48 Stunden" nach Einbringen in die Kultur.

Im Zuge der Auswertung von *fünf Experimenten* erfolgte für folgende Marker eine Befunderhebung:

1.1. Das CD1 Antigen

1.1.1. Subcluster CD1a

Fithian (155) und Murphy (156) beobachteten erstmals 1981, daß residente humane Langerhanszellen durch den monoklonalen Antikörper OKT-6 gefärbt werden konnten. Da CD1a von keinem anderen Zelltyp in der Epidermis exprimiert wird, noch auf Keratinozyten erscheint, gilt es als charakteristischer Marker für Langerhanszellen.

Zeitpunkt "Null Stunden" (Referenz)

Epidermis: Die in basaler und suprabasaler Position in der Epidermis eingebetteten LC sind gleichmäßig verteilt. Es zeigt sich eine ausgeprägte, homogene Färbung der Zelleiber und der Dendriten. Letztere lassen sich präzise in ihrem Verlauf verfolgen. Sie scheinen den oberen Schichten der Epidermis zuzustreben, um dann im Stratum granulosum einen zur Hautoberfläche parallelen Verlauf einzuschlagen. Als herausragend erscheinen lokal immer wieder Areale, in welchen die Zelleiber sowie die Dendriten eine, im Vergleich zu den restlichen LC, deutlich verstärkte Färbung aufweisen. Dieses Phänomen betrifft in der Regel Gruppen von etwa drei bis vier LC ("hot spots", vgl. auch MHC Klasse II)

Dermis: Der Großteil jener Zellen innerhalb der Dermis, welche CD1a+ sind, gruppieren sich in erster Linie um kleinere und größere Blutgefäße der papillären Dermis. Sie scheinen sich diesen an ihrer Außenseite anzuschmiegen. Fallweise finden sich CD1a+ Zellen auch im Bereich größerer Gefäße in der retikulären Dermis. Singuläre Zellen, von dendritischem Charakter liegen überdies subepidermal in dem Raum zwischen der Basalmembran und den ersten kleinen Gefäßen der papillären Dermis. Gelegentlich kann man angefärbte Zellen erkennen, von welchen sich ein Teil noch in der Epidermis befindet, der andere Teil jedoch schon auf dermale Terrain fußgefaßt hat (emigrierende oder immigrierende LC). Auch Talgdrüsenepithel weist Zellen auf, die durch OKT-6 deutlich anfärbbar sind.

Zeitpunkt "24 Stunden"

Epidermis: Obgleich sich Verteilung und Dichte der LC in weiten Teilen der Epidermis unverändert präsentieren, so vermittelt doch eine, wenn auch moderate Abnahme der LC-Dichte in einzelnen Arealen, insgesamt den Eindruck einer abnehmenden Tendenz. Verstärkt wird diese Impression außerdem dadurch, daß die Dendriten vieler LC "verkürzt" erscheinen. Die LC wirken deshalb nicht mehr so grazil, scheinen plumper. LC, welche noch zum Zeitpunkt "Null Stunden" eine basale Position einnahmen sind jetzt nicht mehr auffindbar, die übrigen LC liegen nach wie vor suprabasal.

Dermis: Das Bild entspricht im wesentlichen jenem der nicht kultivierten Haut.

Zeitpunkt "48 Stunden"

Epidermis: Arealen, welche nach wie vor eher unverändert scheinen, stehen nunmehr Gebiete mit stark reduzierter Dichte dendritischer Zellen gegenüber, in welchen die verbliebenen LC eine sehr starke Färbeintensität aufweisen. Die Zellen liegen in den meisten Fällen basal. Ihre Dendriten lassen die, für frühere Zeitpunkte so typische Ausrichtung zur Hautoberfläche hin, vermissen. Die Epidermis über den plump erscheinenden LC wirkt (CD1a-) "leer". Gelegentlich kann man Areale erkennen, in welchen es offensichtlich zu einer gesteigerten Proliferation "intra culturam" der Epidermis kam. Sie erscheint verbreitert und die an dieser Stelle liegenden LC lassen eine ungewöhnliche Lage erkennen. Sie wirken zu den obersten Schichten der Epidermis abgedrängt und ihre Dendriten zwischen die obersten Schichten gedrängt.

Dermis: Während indess in den Papillen lokal eine Zunahme gruppierter CD1a+ Zellen um kleine Gefäße (ohne erkennbaren Kontakt) zu verzeichnen ist, wirken die ursprünglich entlang der Gefäße angelagerten CD1a+ Zellen, was die Intensität der Färbung betrifft, abgeblaßt. In Summe scheint die Gesamtheit des, in der Dermis detektierten CD1a im Vergleich zu den Zeitpunkten "Null" respektive "24 Stunden" reduziert.

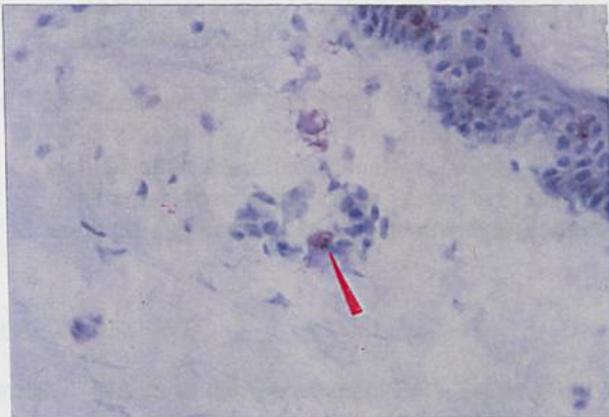


Abb.2. Seltener Befund einer sich offenbar *im Lumen* eines dermalen Blutgefäßes befindenden CD1a+ dendritischen Zelle (Pfeil). Spekulativ könnte es sich dabei um eine aus dem Blutgefäßsystem *in die Haut einwandernde* (Vorläufer-?) Zelle handeln. Peroxidasefärbung. (x200)

1.1.2. Subcluster CD1b

Die immunhistochemische Färbung sämtlicher Gefrierschnitte mit dem monoklonalen Antikörper NUT2 (Maus IgG1) ergab zu allen Zeitpunkten folgendes Ergebnis: Während in der *Epidermis* keine Zelle eine Färbung aufwies, konnte zumindest in der papillären *Dermis* in einzelnen Fällen eine schwache Färbung auf einigen wenigen Zellen ausgemacht werden. Diese Zellen standen in keiner Beziehung zu vasculären Strukturen.

1.1.3. Subcluster CD1c

Eine Färbung von Kryostatschnitten aus zwei Experimenten mit dem monoklonalen Antikörper L161 (Maus IgG1) zeigte vor allem eine schwache Färbung auf einigen Zellen der papillären *Dermis*, hingegen konnte für die *Epidermis* kein eindeutiger Färbeeffect konstatiert werden.

1.2. MHC Klasse II Antigene

Seit Rowden (157) und Klareskog (12) 1977 erstmals die Expression von Klasse II Antigenen auf residenten humanen LC beschrieben, gilt es als Faktum, daß LC auf ihrer Oberfläche Moleküle aufweisen, welche durch die Genloci DR, DP und DQ codiert werden. Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers L241/HB55 ermöglichte die Beobachtung dieser Antigene während der Organkultur.

Zeitpunkt "Null Stunden"

Epidermis: Die LC sind gleichmäßig über die gesamte Epidermis verteilt. Sie befinden sich in einer basalen bis suprabasalen Position. Die Färbung betrifft die Zelleiber tendenziell stärker als die Dendriten, welche aber trotzdem ohne Schwierigkeiten bis in die obersten Epidermisschichten verfolgbar sind. Geradezu typisch sind singuläre oder in kleinen Gruppen stehende, äußerst intensiv gefärbte LC, deren Zelleib vergrößert erscheint und deren imponierende Dendriten sämtliche Schichten durchziehen ("hot spots"). Wenngleich auch diese Zellen ob ihrer beeindruckenden Morphologie hervorstechen, so liegt ihr prozentualer Anteil bezogen auf die LC-Gesamtzahl unter 10 Prozent.

Dermis: Es bietet sich dem Betrachter ein verwirrendes Bild, welches das massiv gehäufte Auftreten von MHC Klasse II Antigenen in der Dermis widerspiegelt. Zwischen stark gefärbten Gefäßen finden sich Massen disseminierter DR+ Zellen, deren Dichte mit zunehmender Dermistiefe allmählich abnimmt. Neben angefärbten Zellen im Epithelverband von Talgdrüsen imponieren immer wieder auch die Ausführungsgänge ekkriner Schweißdrüsen.

Zeitpunkt "24 Stunden"

Epidermis: Während die Gesamtzahl DR+ Zellen leicht abgenommen hat, kann für die verbliebenen LC festgestellt werden, daß die Majorität durch eine intensive Färbung sowohl der Zelleiber als auch der Dendriten charakterisiert ist (Zunahme der "hot spots"). Man kann ein dichtes feinretikuläres Färbemuster um die, diese LC umgebenden Keratinozyten erkennen, wobei es sich hierbei offensichtlich um keine dendritischen Strukturen handelt, da letztere dicker erscheinen. Die großen Zelleiber mit ihren abstrahlenden, ausgeprägten Dendriten und dem sich dazwischen ausspannenden Färbenetzwerk zwischen den Keratinozyten weckt im Betrachter unweigerlich den Eindruck eines kleinen, in sich abgeschlossenen Systems.

Dieses morphologische Integral nannte ich ziemlich unwissenschaftlich, aber assoziativ "Bällchen".

Dermis: Hier zeigt sich ein im wesentlichen unverändertes Bild. Die Fülle DR+ Strukturen erschwert eine genauere Bestandsaufnahme möglicher durchlaufener Veränderungen enorm. Dennoch besteht der gewisse Eindruck einer numerische Zunahme stark DR+ Zellen mit angedeuteter dendritischer Morphologie.

Zeitpunkt "48 Stunden:

Epidermis: Man kann eine weitere Abnahme DR+ LC registrieren. Jene LC, die sich noch in der Epidermis befinden, liegen aber nun eher basal. Sie scheinen von immenser Größe zu sein, ihre Dendriten jedoch entbehren der ehemals feinen Aufgliederung, sie wirken plump. Zwischen zahlreichen "Bällchen", gebildet aus ein bis drei LC, dominieren über größere Strecken DR+ Areale, hier erscheint die Epidermis keine LC mehr zu beherbergen.

Dermis: Hier herrscht Analogie zum Zeitpunkt "24 Stunden".

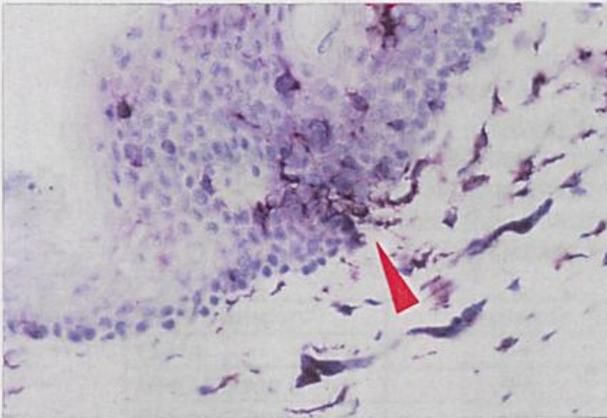


Abb.3. Längsschnitt durch die Haut nach 33 Stunden Organkultur: Areal konzentrierter Emigration stark HLA-DR positiver dendritischer Zellen aus der Epidermis (Pfeil). Peroxidasefärbung. (x200)

1.3. Langerhanszell-Granula (Birbeck-Granula)

Birbeck-Granula sind ein typischer morphologischer Marker für humane LC. Der monoklonale Antikörper "Lag" ist gegen ein Glycoprotein der Granulamembran ($M_r \sim 40.000$) gerichtet (149).

Zeitpunkt "Null Stunden"

Epidermis: Sowohl in der basalen, als auch in der suprabasalen Schicht finden sich viele, gleichmäßig verteilte Lag+ Zellen. Das Färbemaximum liegt im Bereich der Zelleiber. Bei stärkerer Vergrößerung wird bisweilen der granuläre Charakter des Färbemusters deutlich. Keine Anfärbbarkeit zeigen im Gegensatz dazu die Dendriten. Lediglich ausnahmsweise konnte deren Verlauf ansatzweise verfolgt werden.

Dermis: In der Regel kann zu diesem Zeitpunkt keine Lag+ Zelle in der gesamten Dermis geortet werden. Selten einmal fand sich eine einzelne LC in der papillären Dermis.

Zeitpunkt "24 Stunden"

Epidermis: Die Zahl der LC ist geringfügig reduziert. Es fällt die zunehmend basalere Position der verbliebenen Lag+ Zellen auf.

Dermis: Einige wenige angefärbte Zellen bevölkern die papilläre Dermis.

Zeitpunkt "48 Stunden"

Epidermis: Die Anzahl Lag+ DC der Epidermis i.e. LC hat stark abgenommen. Die sich noch in der Epidermis befindenden LC liegen auffallend basal. Die Epidermis erscheint über weite Strecken "leer".

Dermis: Im Gegensatz zur Epidermis weist die Dermis nun eine größere Menge Lag+ Zellen auf, welche in den Papillen einzeln oder in kleinen Gruppen stehen. Manche der gefärbten Zellen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu kleinen Gefäßen. Sie sind intensiv gefärbt, wirken kugelig und plump und zeigen keine Dendriten.

Tabelle 4:
Übersicht über die Intensität der Expression der wichtigsten Marker auf kutanen DC in Epidermis und Dermis zu verschiedenen Entnahmezzeitpunkten (am Gefrierschnitt)

"Null Stunden"	Epidermis	Dermis
CD1a	++	+/-
MHC Klasse II	++	++
Birbeck-Granula	++	-
"24 Stunden"		
CD1a	+++	+
MHC Klasse II	+++	++
Birbeck-Granula	++	+/-
"48 Stunden"		
CD1a	+++	+
MHC Klasse II	+++	+++
Birbeck-Granula	++	++

2. Das epidermale Häutchenpräparat ("sheet" - Präparat)

Die Anfertigung und immunhistochemische Färbung epidermaler "sheets" stellt eine *zweite*, weitere Möglichkeit dar, die Verteilung und Dichte epidermaler LC sowie deren Morphe und Wanderungskinetik zu beurteilen. Epidermale "sheets" enthalten, im Vergleich zu Gefrierschnitten, ganze, vollständige Zellen. Die Trypsin-freie Präparation schützt vor Alteration der Antigenität. Wesentliche Bedeutung erlangt die "sheet"-Präparation bei der Beurteilung der Quantität der LC. Die Evaluation ist leicht und reliabel.

2.1. LC-Morphologie und Expression von CD1a, MHC Klasse II sowie Langerhanszell-Granula im Verlauf der Organkultur

2.1.1. CD1a-Antigen

Färbungen von "sheets", welche frischer nicht kultivierter Haut entstammen (*Zeitpunkt "Null Stunden"*) veranschaulichen deutlich die gleichmäßige Verteilung CD1a+ dendritischer Zellen i.e. Langerhanszellen in der Epidermis. Alle Langerhanszellen sind stark positiv angefärbt und ihre feingliedrig erscheinenden Dendriten lassen sich mühelos verfolgen. Vereinzelt kann man Zellen erkennen, welche stärker gefärbt scheinen als andere. Zudem wirken diese größer und ihre dendritischen Fortsätze sind kürzer und nicht von jener Zartheit wie die der restlichen Zellen.

Bereits *nach 24 Stunden in Kultur* läßt sich eine geringfügige Abnahme der Langerhanszellzahl nachweisen. Schon jetzt wird deutlich, daß sich die Reduktion der Langerhanszellichte nicht gleichmäßig über die gesamte Epidermis erstreckt, sondern regional akzentuiert erscheint. Die *in situ* verbliebenen CD1a+ Zellen zeigen nun mehrheitlich jene Morphologie, wie sie zum Zeitpunkt "Null Stunden" nur bei einige wenigen zu finden war: stärker gefärbte, größer und plumper erscheinende Langerhanszellen.

48 Stunden nach Kulturbeginn hat sich der Exodus epidermaler dendritischer Zellen weiter erhöht. Es bestätigt sich weiters die in allen Experimenten gefundene regional akzentuierte Abnahme der Langerhanszellichte. Die Epidermis erscheint mancherorts "leer", während sich an anderer Stelle noch einige jener großen, plumpen Zellen befinden.

2.1.2. MHC Klasse II

Auch die Detektion von HLA-DR demonstriert zum *Zeitpunkt "Null Stunden"* eine gleichmäßige Verteilung MHC Klasse II tragender dendritischer Zellen. Das Bild ähnelt stark dem der OKT-6 Färbung. Alle Zellen sind stark angefärbt und die Dendriten sind deutlich erkennbar. Jedoch treten öfter Zellen bzw. Zellgruppen auf, welche sehr stark DR+ sind, größere Zelleiber und imposantere Dendriten aufweisen als die übrigen ("hot spots", siehe Abb.4.). Zellen mit diesen besonderen Merkmalen sind jedoch, bezogen auf die Gesamtheit DR+ Zellen, nicht gleichmäßig verteilt.



Abb.4. Epidermales "sheet" vor Beginn der Organkultur: Mehrere Langerhanszellen imponieren durch einen vergrößerten Zelleib und eine verstärkte Expression von HLA-DR ("hot spots"). Peroxidasefärbung. (x200)

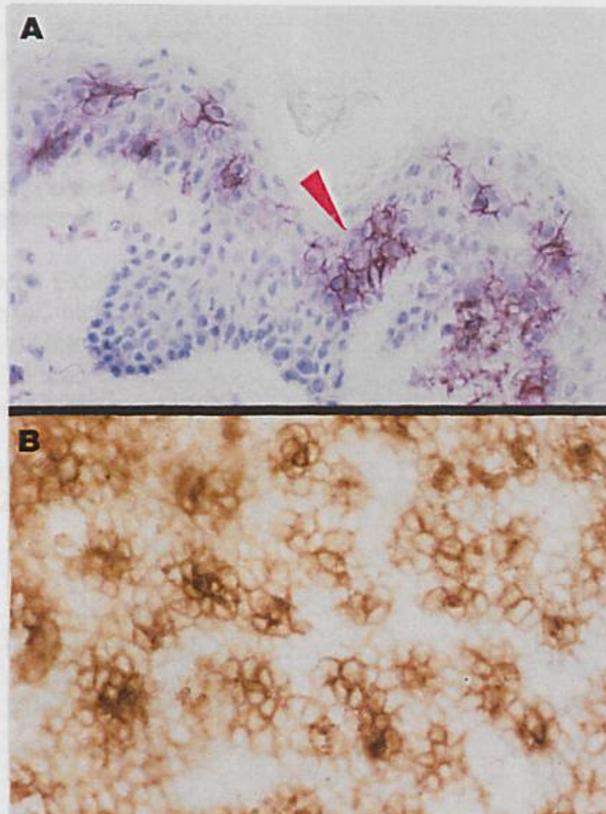
24 Stunden später läßt sich bei leicht reduzierter Gesamtzellzahl objektiv eine deutliche Zunahme der Expression von MHC Klasse II auf den in der Epidermis verbliebenen Langerhanszellen nachweisen. Neben der deutlich intensivierten Färbung stechen außerdem die vergrößerten Zelleiber und die verkürzten und plumper erscheinenden Dendriten ins Auge.

Nach insgesamt 48 Stunden Organkultur hat sich die Langerhanszellendichte weiter verringert, wobei wiederum beachtliche regionale Unterschiede deutlich werden. Die sich noch in der Epidermis befindenden Langerhanszellen scheinen zu immensen Gebilden angeschwollen zu sein. Die Färbeintensität hat sich seit Beginn der Organkultur vervielfacht, die Zellen sind von beeindruckender Größe. Lediglich die Dendriten sind in den meisten Fällen nicht mehr erkennbar. Häufig stehen diese verbliebenen Zellen in kleinen Gruppen. Viele der sich in diesem Bereich befindlichen Keratinozyten scheinen von Färbekongugat zart umflossen. Daraus resultiert optisch ein "bienenwabenartiges Färbemuster" im Bereich verbliebener Langerhanszellen ("Bällchen").

2.1.3. Langerhanszell-Granula (Birbeck-Granula)

Die Auswertung epidermaler "sheets" ergibt zum Zeitpunkt "Null Stunden" hierfür ebenfalls eine völlig gleichmäßige Verteilung LAG+ Langerhanszellen über die gesamte Epidermis. Aufgrund der Lokalisation der detektierten Granula resultiert naturgemäß eine Färbung, welche auf den Zelleib beschränkt ist. Der granuläre Charakter des Färbemusters wird immer wieder deutlich.

Nach 24 bzw. 48 Stunden hat sich die Morphologie der jeweils in der Epidermis verbliebenen Langerhanszellen nicht verändert. Die Reduktion der Gesamtzahl epidermaler dendritischer Zellen entspricht in Ausmaß und Verteilung jener unter 2.1.1. bzw. 2.1.2.



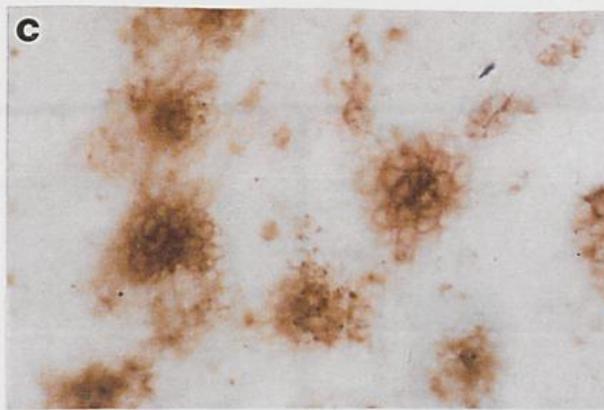


Abb.5. A Längsschnitt durch die Haut nach 48 Stunden Organkultur: Die Darstellung von HLA-DR zeigt neben der intensiven Anfärbung der Langerhanszellen zudem in deren Nähe eine zarte Umsäumung der Keratinozyten: "Bällchen" (Pfeil). Rechts unten: Areal mit massiver Emigration epidermaler dendritischer Zellen in die papilläre Dermis. Peroxidasefärbung. (x200). **B,C** Epidermales "sheet" nach 24 und 48 Stunden: Deutliche Anfärbung der Keratinozyten im Bereich der Langerhanszellen ("Bällchen"). Peroxidasefärbung. (x250)

3. Epidermale Emigrationskinetik

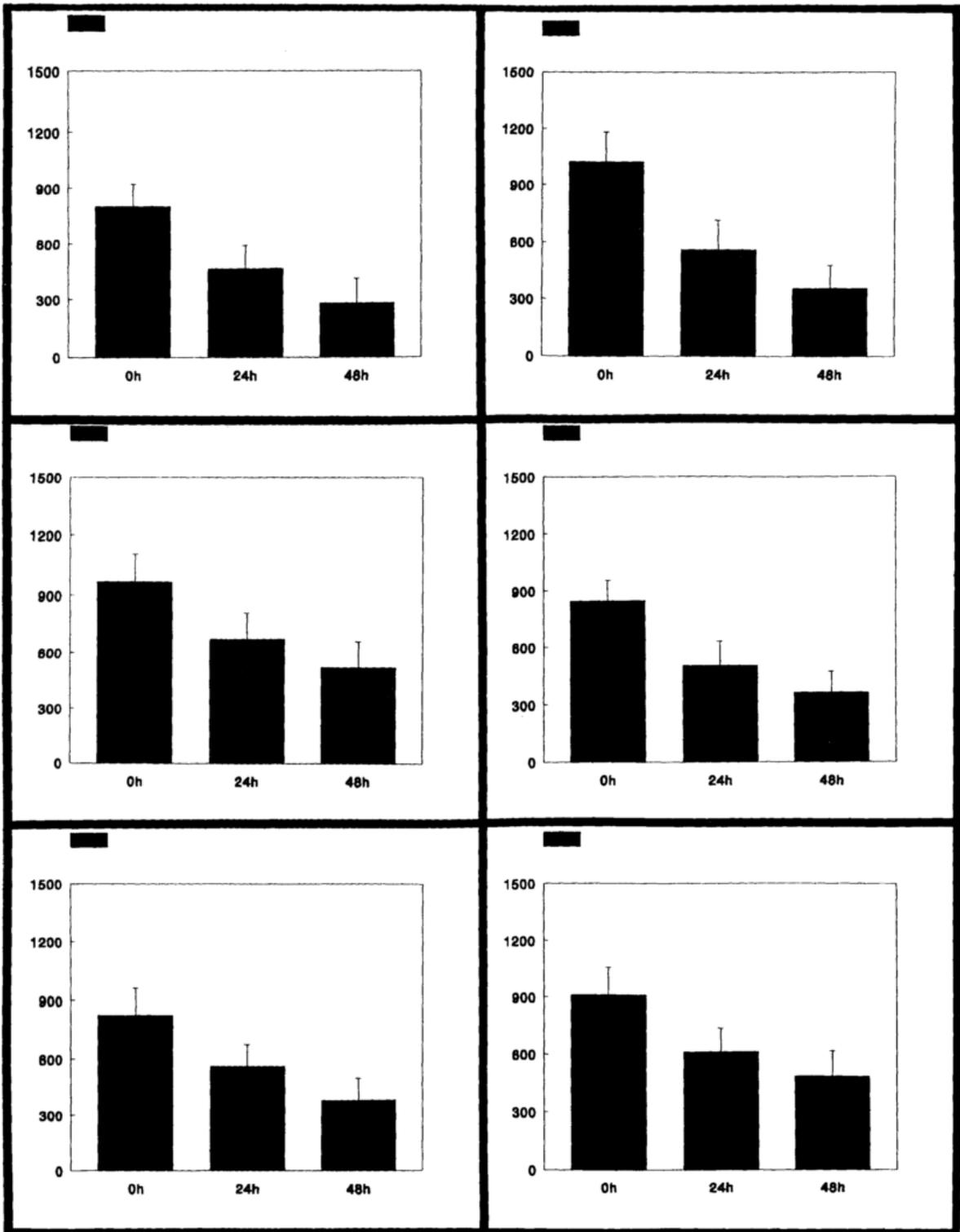
3.1. Emigrationskinetik im klassischen Organkultursystem

Kutane dendritische Zellen i.e. epidermale Langerhanszellen sowie dermale dendritische Zellen (DDC) verlassen die Haut während der Organkultur. Diese Auswanderung erfolgt spontan, d.h. ohne gezielte Einflußnahme vonseiten des Experimentators. Das Augenmerk sollte auf die *Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis* gerichtet sein. Die Evaluation der Langerhanszellichte erfolgte an epidermalen "sheets", welche mit dem monoklonalen Antikörper LAG gefärbt wurden. Die Verwendung dieses Antikörpers wurde bewußt für diesen Zweck gewählt, da sich die Färbung auf den Zelleib beschränkt. Dies schafft optische Übersichtlichkeit und erlaubt eine präzise Auswertung, insbesondere im Bereich gruppiert angeordneter Zellen. (Evaluationstechnik siehe Material & Methodik).

Die Evaluation von *sechs* Experimenten (*sechs* verschiedene Patientinnen) ergab folgendes Ergebnis: Die in der Epidermis frischer, nicht kultivierter Haut erhobene Langerhanszellichte reduziert sich nach 24 Stunden Organkultur im Mittel um 37% (31 - 46%), nach 48 Stunden um durchschnittlich 56% (46 - 66%). Nach den ersten 24 Stunden der Organkultur werden im Mittel 66% (60 - 70%) der letztendlich nach 48 Stunden erreichten Gesamt-emigrationsleistung erbracht.

Tabelle: Zusammenfassung: Emigrationskinetik der Langerhanszellen im klassischen Organkultursystem. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

	0h	24h	Reduktion	48h	Reduktion
Exp. 1	800 ± 124	464 ± 125	42%	280 ± 128	65%
Exp. 2	1025 ± 159	562 ± 153	46%	355 ± 124	66%
Exp. 3	966 ± 138	672 ± 139	31%	521 ± 140	46%
Exp. 4	843 ± 110	502 ± 128	41%	362 ± 109	58%
Exp. 5	826 ± 132	561 ± 114	33%	379 ± 121	55%
Exp. 6	913 ± 142	612 ± 126	33%	486 ± 134	47%
Mittel	895 ± 134	562 ± 130	37%	397 ± 126	56%



Graphik: Emigration humaner Langerhanszellen im klassischen Organkultursystem.
 Legende: *x-Achse* - Dauer der Organkultur, *y-Achse* - Mittlere Zahl der Langerhanszellen/mm² ± Standardabweichung; Experiment 1-6 (von l.o. nach r.u.)

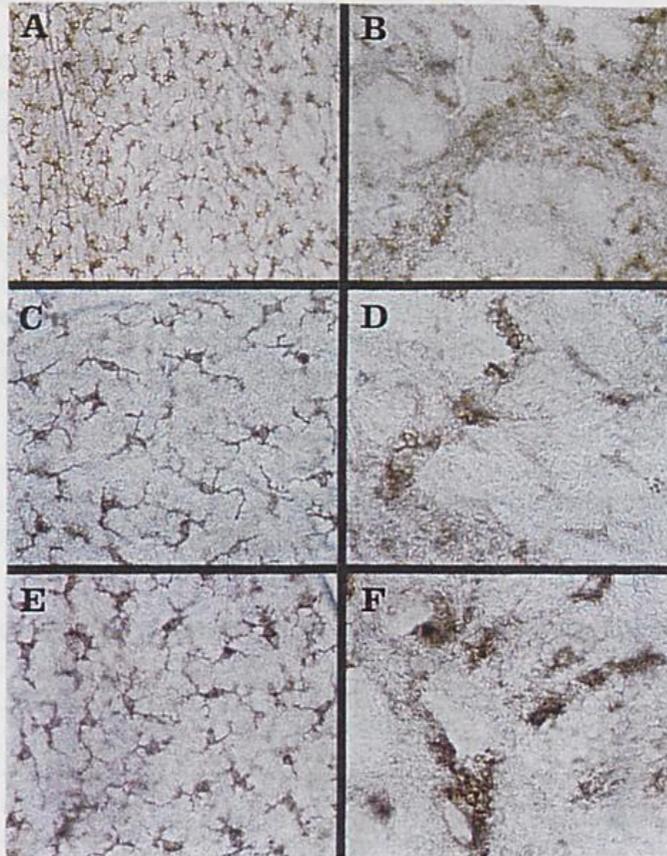


Abb.6. Epidermale Langerhanszellen verlassen die Epidermis während der Organkultur. **A,C,E** Langerhanszellendichte vor Beginn der Organkultur. **B,D,F** Dichte nach 48 stündiger Kultur. **A/B** Darstellung von *CD1a*. (x120), **C/D** Darstellung von *CD1a*. (x230), **E,F** Darstellung von *HLA-DR*. (x230). Peroxidasefärbung.

3.2. Emigrationskinetik im "Epidermis-only"- System

Für die Durchführung der klassischen Organkultur wurden Hautproben verwendet, welche neben der gesamten Epidermis auch einen dermalen Anteil aufwiesen. Für dieses System sollte, wie in Abschnitt III./3.1. ausgeführt, die Kinetik der Emigration primär untersucht werden. Um jedoch mehr über die potentielle Bedeutung des dermalen Anteils in bezug auf das Emigrationsverhalten zu erfahren, sollte alternativ respektive ergänzend das Emigrationsverhalten von Langerhanszellen aus "vitalen epidermalen sheets" untersucht werden.

Das *Procedere* bestand zunächst in der allgemeinen Vorbereitung der Haut auf die Kultur, so wie dies in Abschnitt II./6.1. detailliert beschrieben wurde. Anschließend wurde die Epidermis mittels Dispase-Technik abgelöst und direkt mit der dermalen Seite nach unten auf 1.5 ml Nährmedium (24-well Kulturplatten) zum Aufschwimmen gebracht. Die Kulturbedingungen entsprachen jenen des klassischen Systems.

Ergebnis:

Referenz-"sheets"(Zeitpunkt "Null Stunden") sowie "sheets" der Zeitpunkte 24 bzw. 48 Stunden wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD1a, HLA-DR sowie Birbeck-Granula gefärbt und ausgewertet. Die *Morphologie* der Langerhanszellen sowie die Verteilung und Ausprägung der Marker entspricht jener, wie sie unter Abschnitt III./2.1 beschrieben wurde. Jedoch werden die einzelnen Phasen schneller durchlaufen und insbesondere die *Emigration* erfolgt, wie in der tabellarischen Übersicht ausgewiesen, wesentlich akzeleriert: Die Evaluation *fünf* verschiedener Experimente zeigte, daß sich die ursprüngliche Langerhanszellendichte nach 24 Stunden Kultur um durchschnittlich 49% (44 - 57%) verringert hatte, die Reduktion nach 48 Stunden sogar 82% (76 - 87%) erreicht. Diese Werte liegen deutlich über jenen des klassischen Systems. Weitgehend Übereinstimmung herrscht jedoch im relativierten zeitlichen Ablauf der Emigration. So sind nach 24 Stunden Kultur im Mittel 60% (55 - 64%) der über den Zeitraum von 48 Stunden beobachteten Gesamtmigration bewältigt. Schlußendlich werden die hohen Emigrationsraten des "Epidermis-only"-Systems somit in den letzten 24 Stunden der Organkultur erreicht. Um sicher zu gehen, daß die so massive und beschleunigte Emigration eine aktive war und seine Ursache nicht in einem Zerfall der epidermalen Zellverbandes gründete, wurden die "sheets" sorgfältig lichtmikroskopisch untersucht, wobei bei zunehmendem Abblenden deutlich die Homogenität des Keratinozytenverbandes sichtbar wurde. Die Richtigkeit dieses Eindruckes bestätigte schließlich eine Färbung der Kerne mit Hämatoxylin.

Auf dem Boden der Kulturgefäße ("wells") ließen sich zudem große Mengen dendritischer Zellen nachweisen. Nach dem "Poolen" der Zellen sämtlicher "wells" erfolgte eine Auszählung nach vorheriger Vitalfärbung. Diese ergab ein Verhältnis DC : Keratinozyten von 19 : 1. Dieser Befund spricht klar gegen ein bloßes Zerfallen der Epidermis. Die DC-Viabilität lag bei 84%.

Tabelle: Emigrationskinetik der Langerhanszellen im "Epidermis-only"-System. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

	0h	24h	Reduktion	48h	Reduktion
Exp. 1	826 ± 102	462 ± 91	44%	164 ± 44	81%
Exp. 2	865 ± 123	414 ± 65	52%	120 ± 43	87%
Exp. 3	916 ± 99	394 ± 86	57%	100 ± 39	90%
Exp. 4	996 ± 138	505 ± 69	49%	239 ± 80	76%
Exp. 5	965 ± 112	542 ± 94	44%	298 ± 76	79%
Mittel	913 ± 114	463 ± 81	49%	184 ± 56	82%

B. LANGERHANSZELLEN EMIGRIEREN IN DIE DERMIS WÄHREND DER ORGANKULTUR

1. Standard-Organkultur

Folgende *These* sollte untersucht werden: Langerhanszellen, welche in der Epidermis nicht mehr immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten, waren im Verlaufe der Organkultur in die darunterliegende Dermis emigriert.

Der experimentelle *Ansatz* bestand in der Anfertigung dermalen Transversalschnitte (wie im Kapitel Material & Methodik detailliert beschrieben) von Hautproben der Zeitpunkte "Null Stunden" (Referenz), "24 Stunden", "33 Stunden", "48 Stunden", sowie in Einzelfällen "72 Stunden". Diese Transversalschnitte wurden anschließend mit den drei Standardantikörpern gegen *CD1a*, *HLA-DR* und *Birbeck-Granula* auf emigrierte Langerhanszellen "abgetastet" und die Zielzellen mittels Immunfluoreszenz visualisiert.

Die *Auswertung* erfolgte nicht wie bei jener "epidermalen sheets" in quantitativer Art und Weise, sondern sollte den Grundsätzen der *semiquantitativen* Annäherung sowie insbesondere der *deskriptiven* Beurteilung folgen.

1.1 Die Dermis zum Zeitpunkt "Null Stunden" (nicht kultiviert, Referenz) (n=5)

In der papillären Dermis sind zahlreiche *CD1a+* Zellen anzutreffen. Diese Population setzt sich einerseits aus Zellen zusammen, die einen runden bis polygonalen Zelleib aufweisen und einzelne, zarte Dendriten erkennen lassen, sowie andererseits aus solchen, deren Zelleib ein länglicher ist. Diesem entspringen kurze, rudimentär wirkende Dendriten, welche häufig in der Längsachse des Zelleibes von größerer Ausdehnung sind. Doppelfärbungen *CD1a/HLA-DR* zeigten, daß es sich bei derartigen Zellen um dendritische Zellen handelt, welche kleineren Blutgefäßen des papillären Plexus außen anliegen.

Ein weitaus komplexeres Bild der Dermis erhält man nach Detektion von *HLA-DR*. Es imponieren die stark angefärbten Gefäße. Diesen liegen zahlreiche *DR+* Zellen an (siehe oben). Weiters erkennt man eine große Zahl an einzelstehenden, stark Klasse II positiven Zellen von variantenreicher Morphologie. Unter diesen findet man immer wieder relativ große Zellen dendritischen Charakters. Ab und zu springen auch ekkrine Schweißdrüsenausführungsgänge ins Auge. In Richtung der retikulären Dermis nehmen die beschriebenen Strukturen an Häufigkeit ab. Insbesondere die Dichte jener Zellen, die am ehesten den dendritischen zugesprochen werden könnten, hat ihr Maximum eindeutig in der oberen papillären Dermis.

Was den Marker *Birbeck-Granula* betrifft, so ist die Zahl *LAG+* Zellen wenn auch nicht null, so doch sehr gering und unterschreitet jene der *CD1a+* Zellen ganz wesentlich. Am ehesten sind solche Zellen, die im übrigen rundoval erscheinen und häufig eine granuläre Färbestruktur aufweisen, in der oberen papillären Dermis anzutreffen. Lokale Assoziationen mit Gefäßen fehlen. Die retikuläre Dermis erscheint "leer".

1.2. Die Dermis zum Zeitpunkt "24 Stunden" (n=5)

Während für *HLA-DR* sowie *Birbeck-Granula* tendenziell eine leichte Zunahme der entsprechend gefärbten Zielzellen zu eruieren ist, muß dies für die *CD1a+* Zellen verneint werden. Im Gegenteil, in einzelnen Fällen scheint die Zahl dieser Zellen leicht reduziert, was aber letztendlich nicht genau objektivierbar war.

1.3. Die Dermis zum Zeitpunkt "33 Stunden" (n=5)

Auch jetzt ist keine wesentliche Zunahme *CD1a+* Zellen festzustellen. Lediglich an manchen Stellen kann man mehrere solcher Zellen erkennen, die in engerer Nachbarschaft zueinander liegen. In allen Fällen handelt es sich dabei um Zellen, welche nicht kleineren Blutgefäßen anliegen. Auch mit dem Antikörper *LAG* gefärbte Zellen haben eine leichte numerische Zunahme erfahren. Sie liegen ebenfalls "Blutgefäßfern" und zeigen im wesentlichen ein zufälliges Verteilungsmuster. Davon abweichend ist es jedoch durchaus möglich, *LAG+* Zellen zu entdecken, die in kleinen Gruppen ("cluster") stehen oder aber zu zweit oder dritt dicht hintereinander liegen.

Erst die Färbung gegen *HLA-DR* ermöglicht es, die grundsätzliche Verschiedenheit der optischen Eindrücke der "33 Stunden-Dermis" zu jenen der beiden vorherigen Zeitpunkte zu verdeutlichen. Zwischen einer gestiegenen Anzahl stark Klasse II positiver Zellen treten nun kleine Gruppen von *DR+* Zellen hervor, deren räumliche Anordnung von der bisherigen, ungeordnet und zufällig wirkenden, deutlich abweicht. So entdeckt man immer wieder (1.) kleine Gruppen mehrerer, dicht beieinander stehenden Zellen ("cluster"), die ob ihrer immensen Leuchtkraft hervortreten sowie (2.) perlenketten-artig hintereinander liegende, ebenfalls stark *DR+* Zellen. Auffallend und geradezu typisch für diese beiden Verteilungsmuster sind zum einen deren epidermis-nahe Lage innerhalb der Dermis sowie zum anderen ihre runde bis ovale Form, die keinerlei Dendriten erkennen läßt. Zudem wirken diese Zellen im Vergleich zu anderen durch ihre beachtliche Größe.

1.4. Die Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden" (n=5)

Zwei Tage nach Beginn der Organkultur haben die Akkumulationsvorgänge innerhalb der papillären Dermis ihr Maximum erreicht. Während Zahl und Anordnung jener *CD1a+* Zellen, welche kleine Blutgefäße umspinnen, unverändert erscheinen, haben andere an Zahl weiter zugenommen. Trotz der vergleichsweise moderaten Färbeintensität, die eine Aufregulation von *CD1a* auf dendritischen Zellen während der Kultur nicht erwarten läßt, sind trotzdem zahlreiche, einem nicht-zufälligen Verteilungsmuster folgende Akkumulationsformen zu erkennen. Zwischen sog. "clustern" eingestreut finden sich auch einige wenige

große Anhäufungen perlenkettenartig hinter-, und nebeneinander angeordnete CD1a+ Zellen. Diese imposanten Gebilde bestehen oftmals aus einer beachtlichen Anzahl gleichartig wirkender rundlicher Zellen selber Dimension, deren Oberfläche glatt erscheint und die keine Dendriten aufweisen.

Ein noch beeindruckenderes Bild bietet die immunhistochemische Darstellung von *MHC Klasse II* Antigen. Trotz der prima vista unübersichtlichen Fülle an DR+ dermalen Strukturen treten die oben beschriebenen typischen Akkumulationsformen deutlich hervor. Im besonderen betrifft dies die bisweilen mächtigen perlenkettenartig angeordneten Zellmassen, welche sich wie Bänder durch die Dermis schlängeln. Hier liegt eine Zelle dicht neben der nächsten, sodaß die Abgrenzung einzelner Zellen oft nur zu erahnen ist. Dieser Effekt wird zudem durch die immense Leuchtkraft der Zellen verstärkt. Alle Zellen sind gleich groß und zeichnen sich durch ihre dendritenlose runde Form aus.

In unmittelbarer Nähe sind häufig auch solche DR+ Zellen anzutreffen, die ebenfalls eine auffallend intensive Färbung aufweisen, sich jedoch morphologisch von jenen Zellen innerhalb der Akkumulationen dadurch unterscheiden, daß ihr Zelleib kleiner sowie unregelmäßig geformt erscheint und zahlreiche, wenn auch plumpe dendritischen Fortsätze aufweist. Es entsteht der Eindruck einer Art Zwischenform zwischen dem morphologischen Erscheinungsbild einer sich in der Epidermis befindenden Langerhanszelle, sowie dem einer jener großen runden Zellen innerhalb der Akkumulationen.

Auch die Darstellung *Birbeck-Granula* enthaltender Zellen mittels LAG verdeutlicht in Analogie die numerische Zunahme LAG+ Zellen in der oberen Dermis. Doch nicht nur die Quantität hat sich seit früheren Zeitpunkten verändert. Auch die Qualität der Anordnung spiegelt wider, was die Färbungen von CD1a andeuteten bzw. jene von HLA-DR offenbarten: "cluster"-artige und bandförmig erscheinende Anhäufungen einer mehr oder minder großen Menge von Zellen mit zarter, granulärer Färbestruktur. Im Gegensatz zu Klasse II Färbungen sind die Akkumulationen LAG+ Zellen immer wieder in ihrer Gesamtkontinuität unterbrochen und scheinen folglich nicht von jener dichten Kompaktheit zu sein. Dennoch ist lichtmikroskopisch erkennbar, daß diese kurzen "Unterbrechungen" nicht Folge zellulärer Abwesenheit sind, sondern sich ebendort Zellen befinden, die lediglich der Birbeck-Granula entbehren. Gezeigt werden kann dies anhand sogenannter Doppelfärbungsstudien. Hierbei zeigt sich, daß nahezu alle der stark DR+ Zellen sowohl in "clustern" als auch in jenen perlenketten-, bzw. bandförmigen Zellanhäufungen das Antigen CD1a exprimieren, wenn auch scheinbar in vergleichsweise geringem Maße. Dem entgegen weist jedoch nur ein Teil der stark DR+ Zellen Birbeck-Granula auf. Dennoch stellt die Subpopulation von DR+/LAG+ Zellen bezogen auf jene der DR+/LAG- Zellen in allen Fällen die Majorität. Der Anteil ersterer liegt generell zwischen 70 und 100%.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die numerische Zunahme von DR+/CD1a+ Zellen bzw. DR+/CD1a+/LAG+ Zellen in der Dermis im Verlauf der Organkultur durchaus mit der simultan dazu erfolgenden epidermalen Reduktion korreliert.

1.5. Die Dermis zum Zeitpunkt "72 Stunden" (n=3)

Die in 1.4. getroffenen Aussagen gelten in vollem Umfang auch hier.

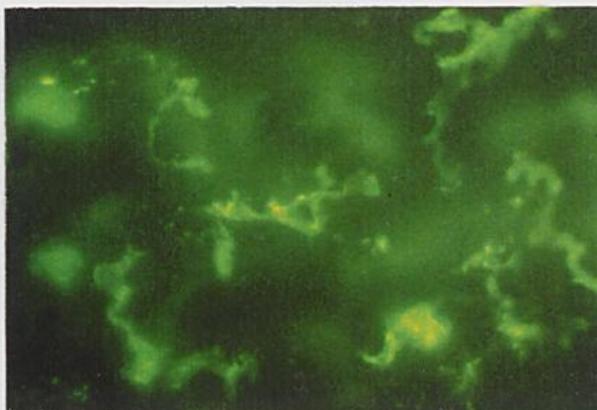


Abb.7. Dendritische Zellen in der oberen papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Darstellung von HLA-DR. Es dürfte sich hierbei sowohl um in der Dermis residente Dermale Dendritische Zellen (DDC) als

auch um Langerhanszellen handeln, welche in Richtung afferente Lymphgefäße wandern. Immunfluoreszenz. (x300)

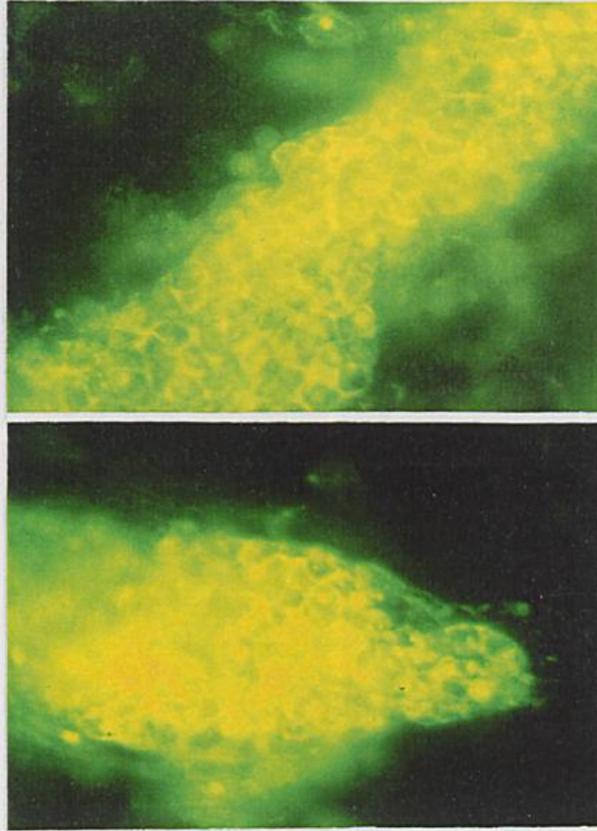
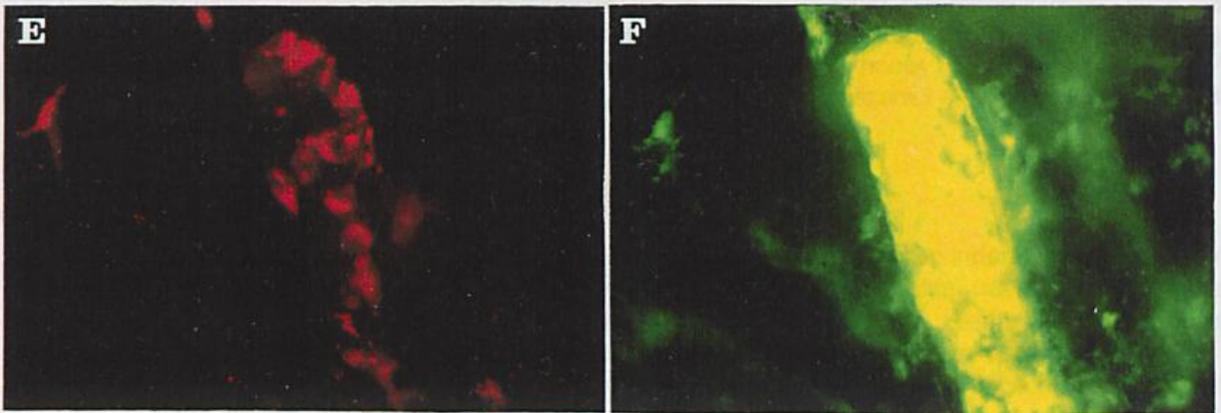


Abb.8. Imposante Akkumulationen stark HLA-DR positiver dendritischer Zellen in der unteren papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Bemerkenswert sind die dichte Zusammenlagerung der Zellen und das typische Fehlen dendritischer Fortsätze (vgl. Abb.7.). Immunfluoreszenz. (x300)



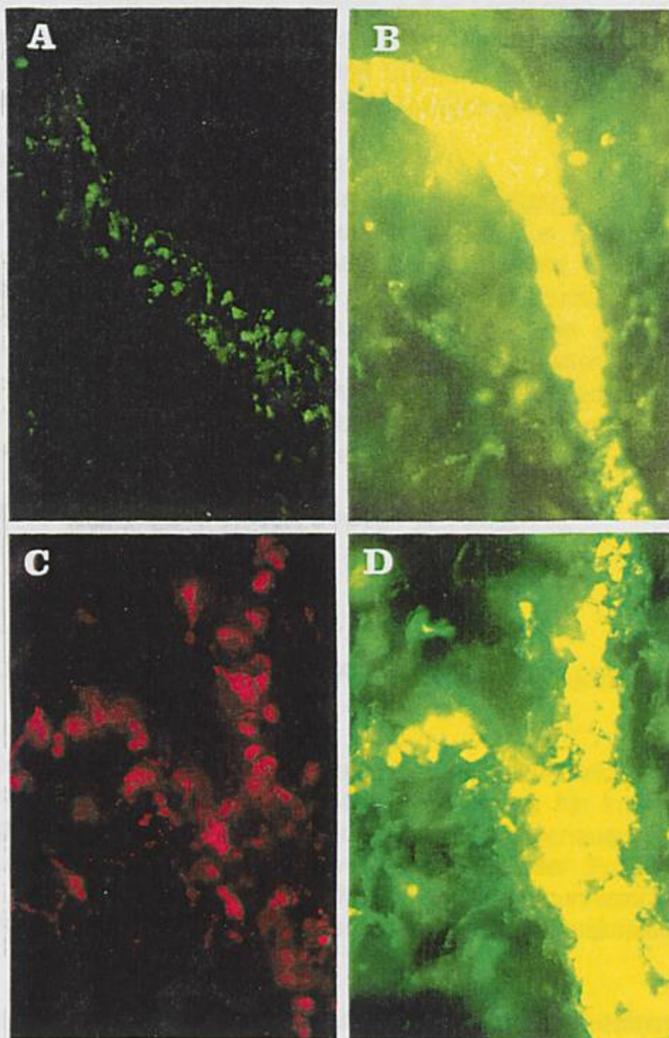


Abb.9. Strangförmige Akkumulationen dendritischer Zellen in der unteren papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. **A** Darstellung der Birbeck-Granula (LAG). (x130). **B** Darstellung von HLA-DR. (x130). **C,D** (x200) **und E,F** (x300) Die Doppelfärbungen verdeutlichen, daß ein hoher Prozentsatz der HLA-DR positiven Zellen (grüne Fluoreszenz) auch das LAG Antigen (rote Fluoreszenz) exprimieren. Daraus läßt sich auf die epidermale Herkunft dieser Zellen schließen.

2. Die "Dermis-only"- Kultur

Um weitere Anhaltspunkte über das (migratorische) Verhalten dendritischer Zellen innerhalb der Dermis im Verlauf einer 48-stündigen Organkultur zu gewinnen, sollte eine alleinige Kultur *vitaler* frischer Dermis erfolgen, nachdem die Epidermis mittels "Dispase-Technik" abgelöst worden war. Hierfür wurde die Dermis unter Verwendung derselben Kulturgefäße wie bei der "Standard-Organokultur" in *zwei Varianten* kultiviert:

(a) Die Dermis wurde so auf der Polycarbonat-Membrane plaziert, daß die ursprünglich der Epidermis zugewandte Seite oben zu liegen kam ("*Dermis-only standard*")

(b) Die Dermis wurde genau umgekehrt aufgelegt, d.h. die ursprünglich der Epidermis zugewandte Seite bekam Kontakt zum Nährmedium ("*Dermis-only invert*").

Mit diesem Vorgehen sollte die *Frage* untersucht werden, ob derart typische Anhäufungen dendritischer Zellen innerhalb der Dermis, wie sie nach Kultur von Vollhaut auftraten, möglicherweise auch bei Fehlen des epidermalen "Zellreservoirs" zustandekommen würden. Die Variante der "inverten" Kultur zielte außerdem darauf ab, eine Richtungsabhängigkeit migratorischer Tendenzen zu demaskieren.

Nach Ablauf der Kulturperiode von jeweils 48 Stunden wurden von den jeweiligen Dermisstücken *dermale Transversalschnitte* angefertigt und diese mit den drei Standardantikörpern gegen *CD1a*, *HLA-DR* und *Birbeck-Granula* nach dem üblichen Protokoll immunhistochemisch gefärbt.

2.1. Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden" (standard) (n=3)

Die Anzahl und Verteilung *CD1a+* Zellen unterscheidet sich grundsätzlich nicht von jener des Zeitpunktes "Null". Auch die Suche nach Zellen mit *Birbeck-Granula* bleibt erfolglos. Lediglich die Detektion von *HLA-DR* zeichnet ein Bild, welches von jenem der frischen Dermis abweicht. Ins Auge fallen primär die stark positiv gefärbten Gefäße, die sich netzförmig über die gesamte obere Dermis erstrecken. Diesen anliegend bzw. dazwischen liegend befinden sich zahlreiche DR+ Zellen. Viele davon entsprechen dem Bild dendritischer Zellen. Nur vereinzelt liegen große, hell fluoreszierende Zellen. Sie sind meist rund bis oval und besitzen kurze plumpe, oder gar keine Dendriten. Ansammlungen oder Zusammenlagerungen von DR+ Zellen, wie diese nach Vollhautkultur nachweisbar waren, sind nirgendwo zu entdecken. Insgesamt liegt die Zahl DR+ Zellen deutlich unter jener bei Vollhautkultur.

2.2. Dermis zum Zeitpunkt "48 Stunden" (invert) (n=3)

Das Bild entspricht dem unter 2.1. dargestellten.

C. LANGERHANSZELLEN AKKUMULIEREN IN AFFERENTEN DERMALEN LYMPHGEFÄSSEN

Das experimentell reproduzierbare Phänomen dermalen Akkumulation dendritischer Zellen in Form von "clustern", über perlenkettenartig hintereinander liegenden Zellen bis hin zu imposanten bandförmigen Zusammenhäufungen ganzer Zellmassen warf die Frage nach dem genauen Ort, der genau definierten histomorphologischen Lokalisation auf. Zur definitiven Klärung dieser Fragestellung von essentieller Bedeutung war neben der bisher angewendeten Methode der Immunhistochemie insbesondere die Semidünn-, und Ultradünnschnittechnik mit anschließender elektronenmikroskopischer Untersuchung.

1. Untersuchung der räumlichen Beziehung sämtlicher Akkumulationsmuster zum dermalen Blutgefäßsystem (n=5)

Vollhaut, die über einen Zeitraum von 48 Stunden nach der Standardmethode kultiviert worden war, wurde mittels Ammoniumthiocyanat in Epidermis und Dermis gespalten und letztere in dermalen Transversalschnitten aufgearbeitet. Für die immunhistochemische Darstellung des dermalen Blutgefäßsystems wurden Primärantikörper gegen *Faktor VIII (von Willebrand)* sowie gegen *Blutgefäßendothel (PAL-E)* [siehe Tabelle 3, Abschnitt II./15.] verwendet.

In Doppelfärbungen, welche die intradermal akkumulierten HLA-DR/FITC gefärbten Zellen den, mit Faktor VIII/Texas Red bzw. PAL-E/Texas Red sichtbar gemachten Blutgefäßen gegenüberstellen, wird die räumliche Distanz zwischen beiden Strukturen deutlich. Dieses Ergebnis falsifiziert somit eindeutig die These einer Akkumulation dendritischer Zellen in dermalen Blutgefäßen im Verlauf der Organkultur.

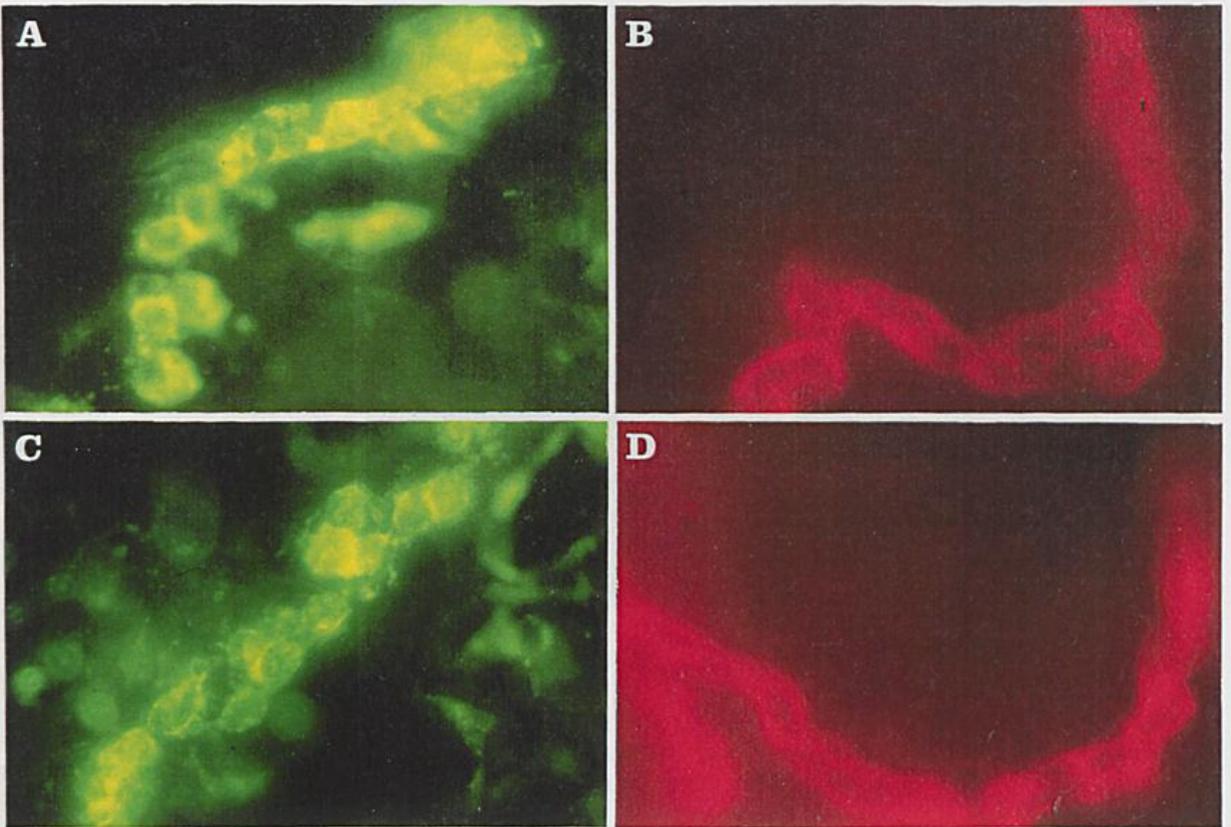


Abb.10. Perlenkettenartige Akkumulation dendritischer Zellen in der tiefen papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Die Doppelfärbungen **A/B** und **C/D** zeigen die klare räumliche Distanz zwischen den HLA-DR positiven dendritischen Zellen (grüne Fluoreszenz) in **A,C** und den Faktor VIII positiven Blutgefäßen (rote Fluoreszenz) in **B,D**. Immunfluoreszenz. (x370)



Abb.11. Akkumulation dendritischer Zellen in der papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. **A/B** Die Doppelfärbung von MHC Klasse II auf den akkumulierten dendritischen Zellen (A) und dem Blutgefäßendothelmarker PAL-E (B) zeigt eindeutig, daß sich die angesammelten dendritischen Zellen nicht in Blutgefäßen befinden. **C** Doppelbelichtung. (x270)

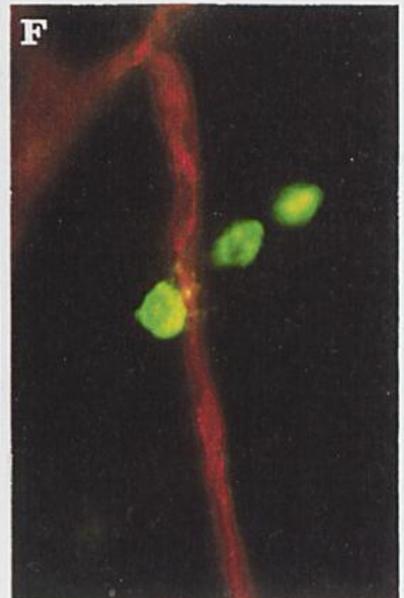
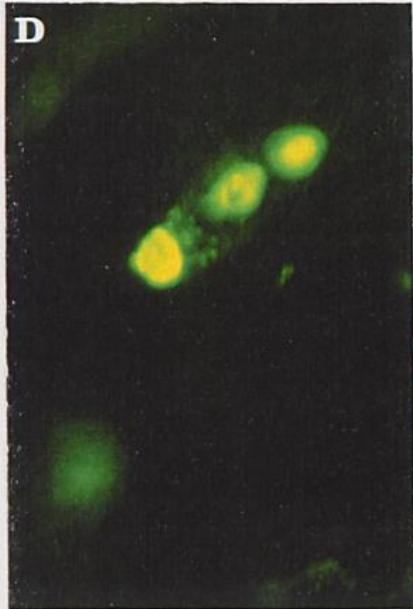
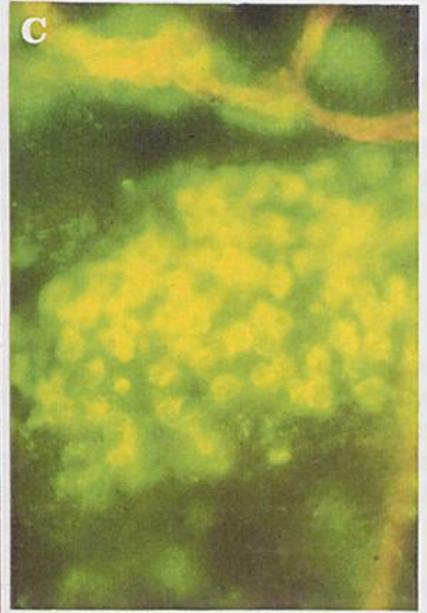
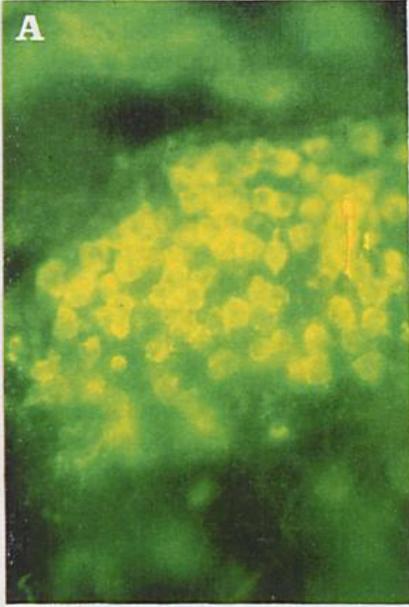


Abb.12. Doppelfärbungen und Doppelbelichtungen der Marker HLA-DR und PAL-E wie in Abb.11.A-C (x230), D-F (x370)

2. Ergebnisse der Semidünnschnitt-Auswertung

Über 48 Stunden kultivierte Vollhaut wurde mit einem Skalpell in winzige Stücke zerkleinert, fixiert und in weiterer Folge systematisch Schnitt für Schnitt aufgearbeitet, bis Akkumulationen dendritischer Zellen sichtbar wurden. Diese Ansammlungen entsprechen den immunhistochemisch detektierten Strukturen. Zahlreiche Zellen, die das typische Aussehen von dendritischen Zellen zeigen, wie lange dünne Zytoplasmfortsätze ("veils"), einen gelappten und exzentrisch positionierten Zellkern sowie ein helles Zytoplasma, liegen in weiten Spalten der papillären Dermis, welche von einem sehr dünnen Endothel ausgekleidet sind. Die charakteristischen Kerne dieser Endothelzellen springen in das Lumen vor.

3. Ergebnisse der Ultradünnschnitt-Auswertung

Die ultrastrukturelle Analysen der in der papillären Dermis akkumulierten dendritischen Zellen zeigen deutlich, daß jene Spalten, innerhalb derer sich diese Zellen befinden, Lymphgefäße repräsentieren. Die Spalten sind von einer dünnen Endothelzellschicht ausgekleidet, welche einer typischerweise *nicht-kontinuierlichen* Basalmembran aufsitzt. Es sind nur kurze Fragmente einer schwach entwickelten Lamina densa erkennbar. Weibel-Palade Körper, charakteristisch für Endothelzellen des Blutgefäßsystems (158,159) fehlen. An manchen Stellen ist die Kontinuität des Endothels unterbrochen. Perizyten sind nicht vorhanden.

Die in den Lymphgefäßen akkumulierten Zellen weisen allesamt Zeichen von reifen dendritischen Zellen auf. So strecken sie nach allen Seiten dünne zytoplasmatische Fortsätze ("veils") aus, welche frei von jeglichen Organellen sind. Die Zellkerne sind stark gelappt. Im elektronen-hellen Zytoplasma sind nur eine geringe Anzahl typischer Lysosomen erkennbar, hingegen eine große Menge glatten endoplasmatischen Retikulums. Auch sog. multivesiculäre Körperchen, die häufig in dendritischen Zellen anzutreffen sind, sind regelmäßig vorhanden. Birbeck-Granula erscheinen in einigen der Zellen. In drei von fünfzehn Zellprofilen wurden auf Anhieb (d.h. ohne Beurteilung von Serienschnitten) Birbeck-Granula gefunden. Verglichen mit der Anzahl von Birbeck-Granula in residenten epidermalen Langerhanszellen, war die Zahl in den akkumulierten dendritischen Zellen deutlich geringer.

Neben dendritischen Zellen können in den Lymphgefäßen auch immer wieder Lymphozyten entdeckt werden, welche gelegentlich mit dendritischen Zellen enge Konjugate bilden. Dieses Phänomen wurde erst kürzlich beschrieben (39).

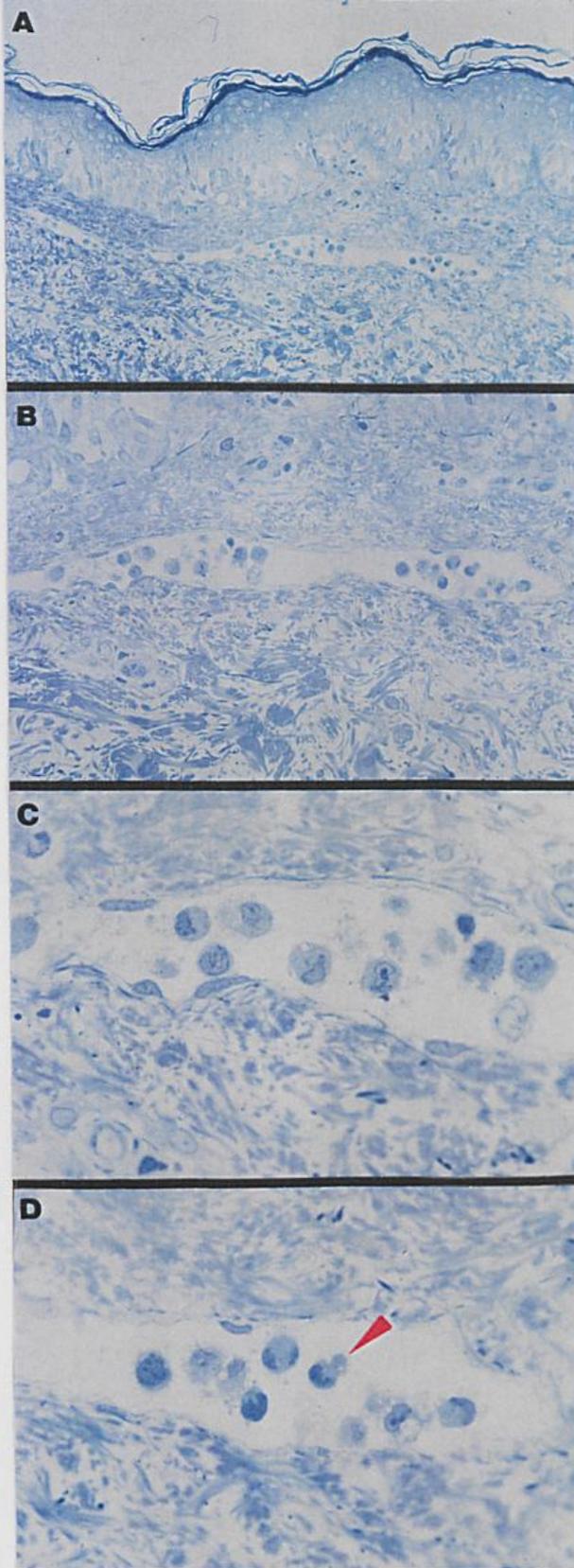


Abb.13. Semidünnschnitte ($1\mu\text{m}$) von über 48 Stunden kultivierter Haut. In einer weiten Spalte der papillären Dermis finden sich zahlreiche Zellen mit einer für dendritische Zellen typischen Morphologie: gelappter, exzentrisch gelegener Zellkern und helles Zytoplasma. **A** (x70), **B** (x150), **C,D** (x400). Der Pfeil weist auf ein Konjugat einer dendritischen Zelle mit einem T-Lymphozyten hin.

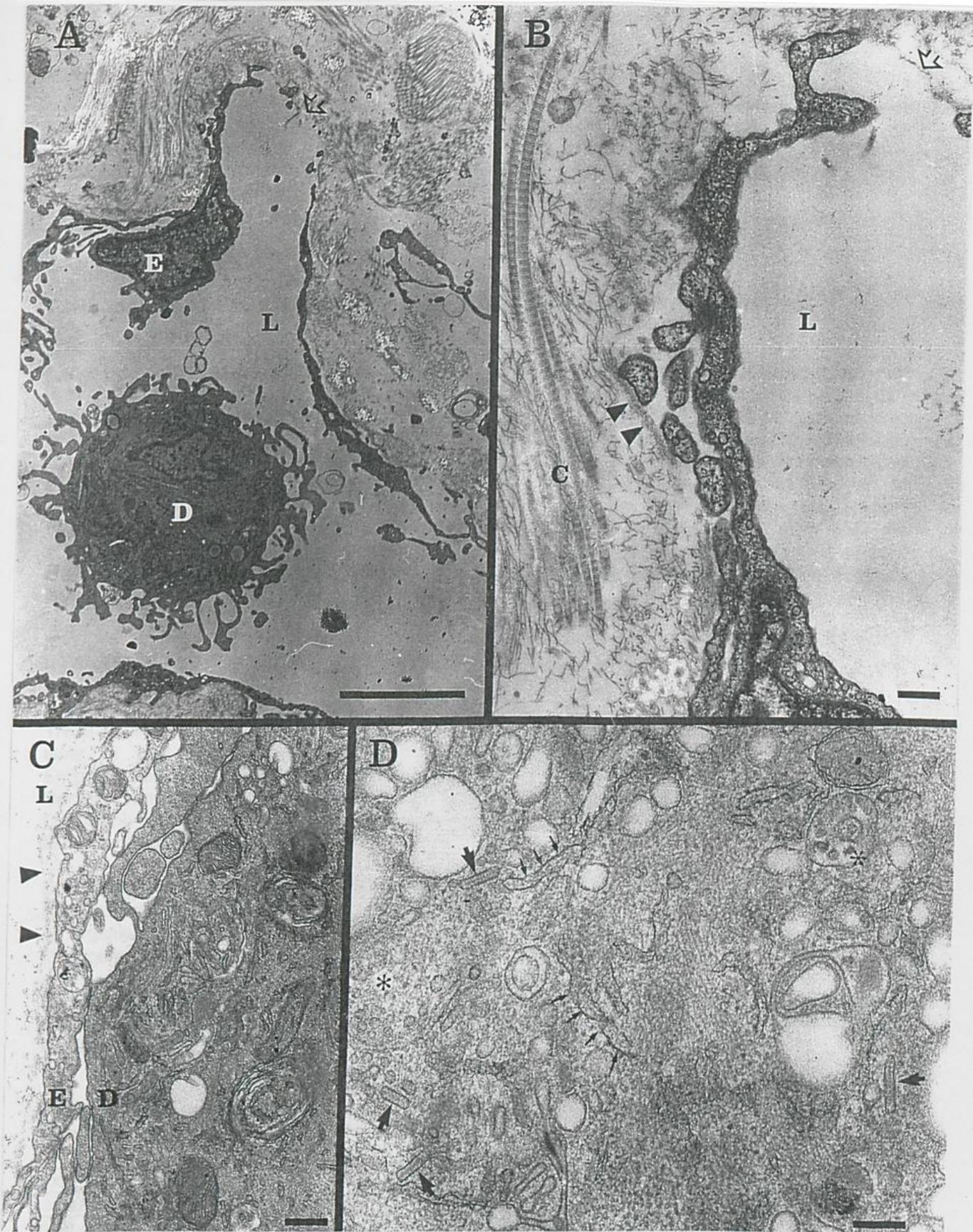


Abb.14. Ultrastruktur eines "cords" nach 48 stündiger Organkultur. Beachtenswert sind die vielen zytoplasmatischen Fortsätze ("veils") der dendritischen Zelle (D) im Lumen eines Lymphgefäßes (L). Das dünne Endothel weist zahlreiche Unterbrechungen auf (offene Pfeile in A und B). Eine Lamina densa ist an

der abluminalen Seite der Endothelzellen (E) nur fragmentarisch vorhanden (Pfeilspitzen in **B** und **C**). Eine kontinuierliche Basalmembran existiert nicht (**B,C**). **D** zeigt stark vergrößert das Zytoplasma einer dendritischen Zelle in einem Lymphgefäß: Birbeck-Granula (dicke Pfeile), glattes endoplasmatisches Retikulum (kleine Pfeile) sowie multivesikuläre Körperchen (Sterne). C, Kollagenfibrillen. **A** (x4800), Balken=5µm **B,C** (x22600), Balken=1µm **D** (x48000), Balken=0,2µm

D. MECHANISMUS DER EMIGRATION VON LANGERHANSZELLEN AUS DER EPIDERMIS

Langerhanszellen verlassen ihre ursprüngliche epidermale Position im Verlaufe der Organkultur, wandern aktiv in die papilläre Dermis und akkumulieren schließlich auf charakteristische Art und Weise in den sich dort befindenden afferenten lymphatischen Gefäßen. Wenngleich auch das Ausmaß der Emigration in gewissen Grenzen variiert, so wird dieser Prozeß prinzipiell in jedem einzelnen Experiment beobachtbar. Da experimentell keine bewußte Stimulation "von außen" zur Ingangsetzung der Langerhanszellwanderung notwendig war, könnte man auch von einer gewissen "Spontaneität" dieses Ereignisses sprechen. In Wirklichkeit aber wird die Wanderung bzw. deren Induktion natürlich keine "spontane" sein, sondern vielmehr des Einwirkens genau definierter Signale und Informationen bedürfen. Um mehr über die sogenannten "Trigger" des Emigrationsprozesses zu erfahren, sollte der Versuch unternommen werden, die im Organkultursystem "spontan" ablaufende Emigration (a) zu stimulieren und (b) zu hemmen. Auch die Rolle von bestimmten Adhäsionsmolekülen sollte untersucht werden.

(a) ANSÄTZE ZUR STIMULATION DER EMIGRATION

1. Versuche mit 2,4,6,-Trinitrochlorobenzol (TNCB) (n=3)

TNCB ist eine toxische Substanz von *kontaktsensibilisierender Potenz*. Diese Eigenschaft sollte im Sinne einer *in vitro* Haptenisierung dafür genutzt werden, eine mögliche weitere Stimulation der Emigrationsprozesse zu erreichen. Für den experimentellen Einsatz wurden dazu 50 mg TNCB einem Gemisch von 4 ml *Olium olivae* und 1 ml Aceton zugesetzt. Diese Lösung wurde dann derart auf die Oberfläche der Hautproben aufgebracht, daß deren Oberfläche gleichmäßig dünn benetzt war. Die gelbe Farbe der Lösung war hierbei hilfreich.

Ein Experiment bestand aus jeweils *drei Ansätzen*:

- (1) Organkultur von unbehandelter Haut über 48 Stunden
- (2) Organkultur von Haut, die mit Aceton/Olivenöl behandelt war (48 Stunden)
- (3) Organkultur von Haut, die mit TNCB/Aceton/Olivenöl behandelt war (48 Stunden)

Die *Auswertung der Ergebnisse* erfolgte einerseits durch randomisierte Erhebung der epidermalen Langerhanszellichte nach 24 und 48 Stunden Kultur sowie der Beurteilung des Ausmaßes dermalen Akkumulationsprozesse.

Tabelle: Einfluß von TNCB auf die Abnahme der epidermalen Langerhanszellichte/mm² inklusive Standardabweichung und prozentualer Reduktion

Exp. 1	0 Std.	24 Std.	Reduktion	48 Std.	Reduktion
unbehandelt	800 ± 124	464 ± 125	42%	280 ± 128	65%
Acet./Oliv.	-	426 ± 113	45%	271 ± 138	65%
TNCB	-	624 ± 111	19%	498 ± 109	38%

Exp.2	0 Std.	24 Std.	Reduktion	48 Std.	Reduktion
unbehandelt	966 + 138	672 + 139	31%	521 + 140	46%
Acet./Oliv.	-	711 + 114	27%	498 + 128	51%
TNCB	-	871 + 142	13%	726 + 132	28%

Exp. 3	0 Std.	24 Std.	Reduktion	48 Std.	Reduktion
unbehandelt	913 + 142	612 + 126	33%	486 + 134	47%
Acet./Oliv.	-	593 + 118	35%	488 + 141	47%
TNCB	-	601 + 131	34%	468 + 122	49%

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die Applikation von 1%iger TNCB-Lösung *keinen stimulatorischen Effekt* auf die Emigrationsrate epidermaler Langerhanszellen ausübt. Im Gegenteil, in 2 von 3 Fällen scheint TNCB die Auswanderung sogar leicht zu hemmen, wobei diese Wirkung bereits nach 24 Stunden deutlich erkennbar ist. Über die Ursache dieses unerwarteten Neutralverhaltens bzw. dieser Emigrationshemmung läßt sich nur spekulieren. Möglicherweise spielen jedoch bei der gewählten TNCB-Konzentration von 1% Langerhanszell-toxische Momente eine entscheidende Rolle.

Haut, die mit Aceton/Olivenöl bestrichen wurde, zeigt keine Unterschiede zur gänzlich unbehandelten Haut. Untersuchungen der jeweiligen *Dermis*, basierend auf der immunhistochemischen Färbung von MHC Klasse II (HLA-DR) an dermalen Transversalschnitten spiegeln erwartungsgemäß die Ergebnisse der "sheet"-Analyse wider. Für die mit TNCB behandelte Haut bedeutet dies, daß sich v.a. zum Zeitpunkt "48 Stunden" zwar deutlich mehr stark DR+ Zellen in der papillären Dermis befinden als zum Referenz-Zeitpunkt "Null", jedoch die Häufigkeit, charakteristische Akkumulationen dendritischer Zellen anzutreffen, weitaus geringer ist als bei Dermis unbehandelter respektive Aceton/Olivenöl-behandelter Haut. Dennoch läßt sich folglich abschließend festhalten, daß selbst unter dem offensichtlich tendenziell inhibitorischen Einfluß von TNCB, eine Emigration erfolgt und es zu Ansammlungen emigrierender Langerhanszellen in afferenten lymphatischen Gefäßen kommt.

2. Versuch der Stimulation durch Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems. Ihre Wirkungen und Einflüsse auf das Zusammenspiel einzelner Subkomponenten des Immunsystems sind vielfältig und komplex organisiert. Auch in der Haut und hier insbesondere in der Epidermis existieren Zellen, die das Signal "Zytokin" senden und/oder empfangen können (160). Es ist berechtigterweise anzunehmen, daß auch die dendritischen Zellen, ihre spezifische Funktion in der Haut betreffend, maßgeblich von komplexen und bisher wenig verstandenen Regelkreisen beeinflusst und gesteuert werden.

Für die nähere Betrachtung der immunologischen Mechanismen der Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis sollten folgende Zytokine auf ihre Wirksamkeit im Rahmen des Organkultursystems untersucht werden:

Zytokin	Arbeitskonzentration	Spezif. Aktivität	Quelle
TNF-alpha	100 U/ml	6×10^7 U/mg	Dr. Adolf, Bender Immunsysteme, Wien
GM-CSF	800 U/ml	5.9×10^6 U/mg	Dr. Liehl, Sandoz Forschungsginst., Wien
IL-1 alpha	100 LAF U/ml	3×10^8 U/mg	Dr. Lomedico, H.-La-Roche, Nutley, NJ
IL-1 beta	100 U/ml	5×10^8 U/mg	Genzyme Corp., Cambridge, MA
"Cocktail"	jeweils detto		

Die angeführten Zytokine wurden vor Beginn der Organkultur dem Nährmedium zugesetzt. Die Dauer der Organkultur betrug in allen Experimenten 48 Stunden. Nach 24 Stunden erfolgte ein Nährmediumwechsel, bei welchem die Zytokine in entsprechender Verdünnung erneut zugegeben wurden.

Nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Anfertigung von (1) Gefrierschnitten, (2) epidermalen "sheets" sowie (3) dermalen Transversalschnitten. Diese drei unterschiedlichen Zugangsweisen sollten es ermöglichen, *erstens* die Veränderungen der Marker CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula zu beurteilen, *zweitens*

repräsentative Daten über die emigrationskinetische Bedeutung der jeweiligen Zytokine zu akquirieren sowie *drittens* Aussagen über die Intensität dermalen Akkumulationsvorgänge zu treffen.

2.1. Tumornekrose-Faktor alpha

2.1.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula

Nach Auswertung immunhistochemisch gefärbter Kryostatschnitte sowie epidermalen "sheets" kann festgestellt werden, daß TNF-alpha auf die Expression obiger Standardmarker *keinen Einfluß* zu haben scheint. Die erhobenen Befunde entsprechen somit jenen der Standard-Organkultur.

2.1.2. Einflüsse auf die Emigrationskinetik

Die Evaluation dreier verschiedener Experimente ergab, daß TNF-alpha in der Lage ist, die Emigrationsrate epidermaler dendritischer Zellen i.e. Langerhanszellen geringfügig zu erhöhen. Für Haut, welche über Nährmedium kultiviert wurde, dem 100 U/ml TNF-alpha zugesetzt worden war, ließ sich bezogen auf die jeweils simultan und ohne TNF kultivierte Haut, eine *Steigerung der Emigration um 6 - 17%* erreichen.

Tabelle: Einfluß von TNF-alpha auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² + Standardabweichung nach 48 Stunden Organkultur.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	895 + 96	409 + 105	56%
TNF-alpha	-	315 + 87	66%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	837 + 111	391 + 76	54%
TNF-alpha	-	335 + 81	60%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	924 + 124	499 + 98	46%
TNF-alpha	-	342 + 72	63%

2.1.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

Die untersuchten dermalen Transversalschnitte lassen *grundsätzlich keine Unterschiede* zu jenen des Standard-Systems erkennen.

2.2. Granulocyten/Makrophagen-Colonie Stimulierender Faktor (GM-CSF)

2.2.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck Granula

Auch hierfür kann festgestellt werden, daß GM-CSF in der verwendeten Konzentration von 800 U/ml keinen, in der Immunhistochemie erkennbaren Effekt auf die Quantität oder Qualität der Expression der drei Standardmarker hat. Allerdings kann bei der Betrachtung von Kryostatschnitten wiederholt folgendes Phänomen beobachtet werden: So finden sich CD1a+/DR+ dendritische Zellen *regional* in sämtlichen Schichten der Epidermis bis direkt unter der Hornschicht. Die am weitesten "oben" liegenden Langerhanszellen wirken plump und lassen die ansonsten gut sichtbaren Dendriten vermissen.

2.2.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Die Zugabe von GM-CSF (800 U/ml) zum Nährmedium hat in der Folge *keinen ersichtlichen Einfluß* auf das Migrationsverhalten epidermaler Langerhanszellen. Der Vergleich der prozentualen Abnahmen der epidermalen Langerhanszellendichte nach 48 Stunden Organkultur verdeutlicht dies: Abnahmen von 56%, 54% sowie 46% bei standardmäßig kultivierter Haut stehen Abnahmen von je zweimal 55% sowie 50% bei GM-CSF gegenüber. Dies entspricht Differenzen von maximal 4%.

Tabelle: Einfluß von GM-CSF auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	895 ± 96	409 ± 105	56%
GM-CSF	-	417 ± 112	55%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	837 ± 111	391 ± 76	54%
GM-CSF	-	384 ± 106	55%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	924 ± 124	499 ± 98	46%
GM-CSF	-	462 ± 102	50%

2.2.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

Es bestehen keine Unterschiede zur Dermis der standardmäßig kultivierten Haut. Es finden sich die gleichen charakteristischen Anhäufungen dendritischer Zellen. Auch der Anteil an LAG+ Zellen, d.h. von der Epidermis stammende Langerhanszellen, an der Gesamtheit der akkumulierten Zellen ist nicht signifikant verändert.

2.3. Interleukin-1 alpha, Interleukin-1 beta

2.3.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula

Sowohl die Auswertung von Kryostatschnitten als auch von epidermalen "sheets" brachte keine neuen Ergebnisse. Quantität und Qualität der Markerexpression auf dendritischen Zellen entsprechen den bisherigen Befunden.

2.3.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Beide Zytokine, IL-1 alpha und IL-1 beta, beeinflussen die Emigration der Langerhanszellen aus der Epidermis nicht (grundsätzlich). Während sich bei Interleukin-1 alpha in drei verschiedenen Experimenten noch eine 3 - 5%ige Steigerung der Emigration erkennen läßt, so pendelt die Emigrationsrate bei Interleukin-1 beta mit einer Abweichung von ± einem Prozent um jene der Standard-Organkultur

Tabelle: Einfluß von Interleukin-1 alpha bzw. Interleukin-1 beta auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	895 ± 96	498 ± 105	56%
Interleukin-1 alpha	-	367 ± 86	59%
Interleukin-1 beta	-	401 ± 92	56%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	837 ± 111	391 ± 76	54%
Interleukin-1 alpha	-	360 ± 88	57%
Interleukin-1 beta	-	394 ± 71	53%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	924 ± 124	499 ± 98	46%
Interleukin-1 alpha	-	453 ± 69	51%
Interleukin-1 beta	-	490 ± 102	47%

2.3.3. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

Die erhaltenen Befunde entsprechen jenen, wie sie schon in 1.3. oder 2.3. kurz beschrieben sind.

2.4. Zytokin-"Cocktail" (TNF-alpha, GM-CSF, IL-1 alpha/beta)

Hierbei kamen alle vier Zytokine simultan zum Einsatz. Die Endkonzentration der einzelnen Zytokine im Nährmedium wurde hierfür nicht verändert.

2.4.1. Einfluß auf die Expression von CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula

Auch die simultane Verabreichung der vier Zytokine führt zu keiner ersichtlichen Änderung der Expression dieser drei Standardmarker. Vor allem an Kryostatschnitten finden sich regional in der Epidermis Areale, in denen die Zelleiber von Langerhanszellen bis knapp unter der Hornschichte detektierbar sind. Diese eigentümliche Lokalisation konnte man schon bei der alleinigen Gabe von GM-CSF beobachten. Außerdem scheint die Zahl LAG+ Zellen in der oberen Dermis nach 48 Stunden erhöht zu sein, was Ausdruck einer gesteigerten Emigration dendritischer Zellen epidermaler Provenienz ist. Ähnliche Befunde sind schon unter dem Einfluß von TNF-alpha erhoben worden. Somit läßt sich festhalten, daß die, im Vergleich zur Standard-Organkultur zusätzlich aufgetretenen Veränderungen vor allem Effekte der Zytokine TNF-alpha sowie GM-CSF zu sein scheinen. Effekte, die aus einer etwaigen Summenwirkung aller vier Zytokine resultierten oder aber solche, welche spezifisch für eine Interleukin-1 Wirkung sein könnten, wurden nicht gefunden.

2.4.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Aus dem simultanen Einwirken der vier Zytokine auf die kultivierte Haut resultiert eine *geringgradige Steigerung* der Emigration. Die prozentuale Reduktion der Langerhanszellendichte über 48 Stunden Organkultur liegt im Mittel etwa 7% (minimal 3%, maximal 10%, n=3) über jener der Standard-Kultur. Diese Abweichungen liegen somit im Rahmen derer, wie sie in etwa bereits bei alleinigem Zusatz von TNF-alpha erreicht wurden.

Tabelle: Einfluß eines Zytokin-"Cocktails" bestehend aus TNF-alpha, GM-CSF, IL-1 alpha/beta auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	895 ± 96	409 ± 105	56%
"Cocktail"	-	374 ± 85	59%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	837 ± 111	391 ± 76	54%
"Cocktail"	-	308 ± 74	64%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	924 ± 124	454 ± 98	46%
"Cocktail"	-	418 ± 92	55%

2.4.3. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

Die Untersuchung dermalen Transversalschnitte ergab keine neuen Aspekte.

(b) ANSÄTZE ZUR HEMMUNG DER EMIGRATION

1. Versuche der physikalischen Emigrationshemmung durch Kühlung

Die Wahl dieses experimentellen Ansatzes wurde durch Vorversuche von U. Ortner angeregt, der es gelang, die "spontane" Emigration von Langerhanszellen aus abgetrennten und danach kultivierten Mausohren dadurch zu hemmen, daß sie die Ohren vor dem Einbringen in die Kultur für etwa 24 Stunden bei 4°C "kühlte". Interpretiert wurde die anschließende Emigrationshemmung ihrerseits durch den infolge der niederen Temperatur nachhaltig erloschenen Entzündungsreiz, der ursprünglich mit dem Abschneiden der Ohren gesetzt worden war (161).

Die emigrationsinhibitorische Potenz dieser Maßnahmen sollte auch für das Humansystem evaluiert werden. Die für die Organkultur vorbereitete Haut wurde also zunächst für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschranks deponiert. Anschließend erfolgte eine standardmäßige Organkultur über 48 Stunden sowie die entsprechenden immunhistochemischen Auswertungen von Epidermis und dermalen Transversalschnitten.

1.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Der Einfluß einer 24-stündigen Kälteeinwirkung auf die emigrationsbedingte Abnahme der Langerhanszellendichte im epidermalen "sheet" erweist sich als sehr *heterogen*. Während in zwei von insgesamt drei Experimenten der Trend tatsächlich in Richtung Emigrationshemmung geht (6 - 19%), so verwundert im anderen Fall die 8%ige Steigerung der Emigrationsrate. Die Ergebnisse im Humansystem weichen somit klar von den im Maussystem erhobenen Daten ab. Wenngleich sich auch fallweise ein gewisser negativer Einfluß auf das Wanderungsverhalten zeigt, so kann von einer effizienten Emigrationshemmung oder Blockade wohl kaum die Rede sein.

Tabelle: Einfluß von Kälte auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	853 ± 106	383 ± 56	56%
Kälte 4°C	-	433 ± 67	50%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	872 ± 89	426 ± 61	52%
Kälte 4°C	-	384 ± 67	46%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	894 ± 98	372 ± 45	59%
Kälte 4°C	-	544 ± 78	40%

1.2. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

Auch die Exploration dermalen Transversalschnitte, welche aus "gekühlter Haut" gewonnen wurden, ergab keine Hinweise für eine signifikante Hemmung der Langerhanszell-Emigration. Nach 48 Stunden Kultur finden sich große Mengen DR+/LAG+ Zellen in der papillären Dermis. Neben zahllosen einzelstehenden Zellen mit teils noch dendritischem Charakter sind auch jene typischen gruppierten Akkumulationen detektierbar, welche "cluster-artig" oder "perlenketten-artig" aneinander gelagert sind. Ein überwiegender Teil dieser stark HLA-DR+ rundlichen und adendritsch-anmutenden Zellen ist LAG+ und enthält somit Birbeck-Granula.

2. Versuch der Emigrationshemmung durch Anti-TNF-alpha

Nachdem im Rahmen der Stimulationsversuche ausschließlich für TNF-alpha ein, wenn auch mäßiger, die Emigration steigernder Effekt eruiert werden konnte, lag es nahe, die Bedeutung dieses Zytokins indirekt durch dessen Blockade in der kultivierten Haut näher zu erforschen. Hierfür wurde *anti-human TNF-alpha* (Kultursupernatant, ATCC: HB9228, Klon: SDW18.1.1, IgG₁kappa, Rockefeller University, NY (162)) dem Nährmedium zu einem 80%igen Anteil zugefügt. Die Organkulturdauer betrug 48 Stunden. Außerdem sollte versucht werden, eine potentielle emigrationshemmende Einflußnahme durch anti-TNF-alpha durch gleichzeitige Zugabe einer "exzessiven" Menge von TNF-alpha (i.e. 1000 U/ml) zu neutralisieren.

2.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Anti-TNF-alpha ist in der Lage, die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis substantiell zu hemmen. In drei Experimenten lag die prozentuale Reduktion der Langerhanszellichte nach 48 Stunden im Mittel um 28% (12 - 41%) unter derjenigen der Standard-Kultur. Dies bedeutet im Mittel eine Hemmung der Emigration um 52% (28 - 76%). Wird dem Nährmedium neben anti-TNF-alpha zusätzlich TNF-alpha im Überschuß (excess TNF-alpha, 1000 U/ml) zugesetzt, so resultiert eine Antagonisierung der emigrationshemmenden Wirkung von anti-TNF. Darüber hinaus ist überschüssiger TNF-alpha in der Lage, die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis im Vergleich zur Standardkultur zu stimulieren. Im Mittel lag die Reduktion der Langerhanszellzahl/mm² 8% (5 - 10%) über jener der Standardkultur. Dies entspricht einer mittleren Stimulation der Emigration um 13% (8 - 19%).

Tabelle: Einfluß von anti-TNF-alpha auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	904 ± 121	353 ± 99	61%
anti-TNF-alpha	-	644 ± 97	29%
anti-TNF-alpha + excess TNF-alpha	-	307 ± 71	66%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	829 ± 98	407 ± 49	51%
anti-TNF-alpha	-	513 ± 89	39%
anti-TNF-alpha + excess TNF-alpha	-	323 ± 82	61%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	886 ± 105	390 ± 67	57%
anti-TNF-alpha	-	832 ± 107	16%
anti-TNF-alpha + excess TNF-alpha	-	310 ± 78	65%

2.2. Einflüsse auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

Wider Erwarten sind trotz der Gegenwart von anti-TNF-alpha während der 48-stündigen Kulturperiode zahlreiche charakteristische Akkumulationen aus stark MHC-Klasse II exprimierenden, rundovalen Zellen entstanden. Prima vista entspricht das immunhistochemische Bild der Dermis dem aller vorangegangenen Experimente. Erst eine Doppelfärbung, welche denjenigen Anteil an akkumulierten dendritischen Zellen in den afferenten lymphatischen Gefäßen demaskiert, die neben der intensiven HLA-DR Expression auch Birbeck-Granula enthalten, offenbart: *DR+/LAG+ Zellen* i.e. dendritische Zellen epidermaler Provenienz, welche bis dato immer die DR+/LAG- Zellen an Zahl deutlich übertrafen, sind plötzlich in der Minderheit. Nur mehr 30 - 50% der im Lymphgefäßsystem angehäuften dendritischen Zellen enthalten offensichtlich Birbeck-Granula respektive stammen somit aus der Epidermis. Wurde im experimentellen Ansatz auch TNF-alpha im Überschuß zugeführt, so werden wiederum alle Merkmale einer intensiven Auswanderung deutlich: Massen dendritischer Zellen in der papillären Dermis sowie prall mit Langerhanszellen gefüllte afferente Lymphgefäße.

Es kann somit festgehalten werden, daß Prozesse dermalen Akkumulation dendritischer Zellen unter dem Einfluß von anti-TNF-alpha weniger in ihrer Quantität, denn vielmehr in ihrer Qualität moduliert werden. Mit dieser Qualität ist in erster Linie die Provenienz der akkumulierten dendritischen Zellen gemeint ist. TNF-alpha im Überschuß ist in der Lage die dargestellten Effekte zu antagonisieren.

2.3. Emigrationshemmende Wirkung von anti-TNF-alpha im "Epidermis-only"-System

Zur weiteren Absicherung der im Standard-Organ Kultursystem erhobenen Daten sollte der Einfluß von anti-TNF-alpha auch im sogenannten "Epidermis-only"-System evaluiert werden. Dieses System schien zu diesem Zweck deshalb besonders geeignet, weil hier das Ausmaß an sog. "spontaner" Emigration beträchtlich höher ist und somit zu erwarten ist, daß das System folglich sensibler auf eine potentiell emigrationsinhibitorische Einflußnahme über anti-TNF-alpha reagieren würde. Auch hier sollte zudem überprüft werden, ob die gleichzeitige Zugabe von TNF-alpha "im Überschuß" (excess TNF-alpha) zu einer Neutralisierung der anti-TNF Wirkung führt.

2.3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

Epidermis, welche dem Einfluß von anti-TNF-alpha ausgesetzt war, weist nach 48 Stunden eine Langerhanszellendichte auf, welche im Mittel um 31% (27 - 51%) über jener der Referenzepidermis liegt. Dies entspricht einer Hemmung der Emigration um durchschnittlich 50% (40 - 53%). Die im Standard-Organokultursystem sowie "Epidermis-only"-System erhobenen Daten korrelieren somit miteinander.

Unter dem zusätzlichen Einfluß von TNF-alpha im Überschuß wird die inhibitorische Wirkung von anti-TNF-alpha neutralisiert. Die Emigration entspricht hierbei jener des Standardsystems. Geringfügige zusätzliche Steigerungen der Emigration durch überschüssigen TNF-alpha, wie dies im klassischen Organokultursystem nachweisbar war, ist nicht feststellbar.

Tabelle: Wirkung von anti-TNF-alpha im "Epidermis-only"-System. Zahl der LC/mm² ± Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only" Standard	865 ± 123	120 ± 43	87%
"E-only" + anti-TNF	-	510 ± 74	41%
"E-only" + anti-TNF + excess TNF-alpha	-	121 ± 53	86%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only" Standard	916 ± 99	100 ± 39	90%
"E-only" + anti-TNF	-	558 ± 89	39%
"E-only" + anti-TNF + excess TNF-alpha	-	138 ± 46	85%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only" Standard	826 ± 102	164 ± 44	81%
"E-only" + anti-TNF	-	387 ± 56	54%
"E-only" + anti-TNF + excess TNF-alpha	-	122 ± 44	85%

3. Versuch der Emigrationshemmung durch humanen TNF- Rezeptor

Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe eines *gelösten TNF-Rezeptors (soluble human TNF receptor p80 linked to the Fc portion of human IgG1, Immunex-Seattle, WA., (163))* zum Nährmedium in der Lage ist, Einfluß auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis zu nehmen. Die Endkonzentration des Rezeptors im Medium betrug 100 µg/ml.

3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem

Nach vergleichender Betrachtung der in drei verschiedenen Experimenten erhobenen Daten läßt sich festhalten, daß die Zugabe löslichen TNF-Rezeptors zum Nährmedium, zumindest in der gewählten Konzentration von 100 µg/ml, *keinen signifikanten Effekt* auf die Emigrationskinetik der Langerhanszellen auszuüben scheint.

Tabelle: Einfluß von löslichem TNF Rezeptor auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (im Standardsystem). Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	974 ± 102	500 ± 98	47%
TNF Rezeptor	-	565 ± 91	42%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	933 ± 122	438 ± 88	53%
TNF Rezeptor	-	467 ± 97	50%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	899 ± 108	391 ± 89	56%
TNF Rezeptor	-	387 ± 93	57%

3.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik im "Epidermis-only"-System

Auch für dieses System ist *kein emigrationsmodulierender bzw. womöglich emigrationshemmender Einfluß* des TNF-Rezeptors nachweisbar.

Tabelle: Einfluß von löslichem TNF Rezeptor auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (im "Epidermis-only"-System). Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	918 ± 110	201 ± 83	78%
"E-only"+TNF Rez.	-	185 ± 91	80%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	967 ± 132	182 ± 90	81%
"E-only"+TNF Rez.	-	164 ± 79	83%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	869 ± 121	244 ± 74	72%
"E-only"+TNF Rez.	-	213 ± 82	78%

4. Versuch der Emigrationshemmung durch Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein

Rekombinantes humanes Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein (164) (von Daniel E. Tracey, The Upjohn Company, Kalamazoo, MI) wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 100 ng/ml zugesetzt. Analog zu den Untersuchungen mit löslichem TNF Rezeptor sollten die Auswirkungen eines etwaigen emigrationsmodulierenden Effektes erfaßt werden.

4.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem

Da die Reduktionsraten der Langerhanszellidichte unter dem Einfluß von IL-1 Rezeptor Antagonist in drei verschiedenen Experimenten nur unwesentlich und ungerichtet von jenen der Referenzexperimente

abweicht, ist zu folgern, daß die Zugabe obigen Proteins in der gewählten Konzentration von 100 ng/ml *keinen substantiell emigrationsmodulierenden Einfluß* ausübt.

Tabelle: Einfluß von Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (im Standardsystem). Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	974 + 102	500 + 98	47%
IL-1 RA	-	552 + 101	43%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	933 + 122	438 + 88	53%
IL-1 RA	-	418 + 92	55%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
Standard	899 + 108	391 + 89	56%
IL-1 RA	-	430 + 81	52%

4.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik im "Epidermis-only"-System

Es bestehen *keine ersichtlichen Effekte*.

Tabelle: Einfluß von Interleukin-1 Rezeptor Antagonist auf die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (im "Epidermis-only"-System). Zahl der LC/mm² + Standardabweichung.

Exp. 1	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	918 + 110	201 + 83	78%
"E-only" + IL-1 RA	-	194 + 98	79%

Exp. 2	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	967 + 132	182 + 90	78%
"E-only" + IL-1 RA	-	154 + 76	84%

Exp. 3	0 Stunden	48 Stunden	Reduktion
"E-only"	896 + 121	244 + 74	72%
"E-only" + IL-1 RA	-	109 + 64	68%

(c) EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN

Im folgenden soll auf vier verschiedene Adhäsionsmoleküle eingegangen werden, die mehr oder weniger im Verdacht stehen, an Prozessen der spezifischen Ansiedelung ("homing") von Leukozyten beteiligt zu sein bzw. durch eine mögliche Fluktuation deren Expression induktiv oder regulatorisch in Wanderungsprozesse einzugreifen. Um zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Emigration

von Langerhanszellen aus der Epidermis zu gelangen, sollte die Expression dieser vier gewählten Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Organkultur mittels immunhistochemischer Methodik erfaßt und beurteilt werden.

1. E-CADHERIN

Cadherine sind Calcium²⁺ abhängige homophile Adhäsionsmoleküle, welche für eine normale Entwicklung und Funktion epithelialer Gewebe unerlässlich sind (165). Besonders desmosomale und extradesmosomale Cadherine (E- und P-Cadherin) sind in starkem Maße in der Epidermis von Säugern repräsentiert und sich wesentlich an der Keratinozyten-Keratinozyten Adhäsion beteiligt (166). Tang et al. (167) berichteten, daß murine Langerhanszellen E-Cadherin exprimieren und dieses maßgeblich an der Bindung der Langerhanszellen an die Keratinozyten beteiligt sei und mutmaßen, daß diese Interaktion auch im Rahmen der Langerhanszellemigration eine entscheidende Rolle spiele. Auch für das Humansystem konnte erst jüngst nachgewiesen werden, daß Langerhanszellen E-Cadherin exprimieren (168). Die Expression von E-Cadherin wird während der Kultivierung (167) oder als Antwort auf die Applikation von Kontaktallergenen (169) vermindert.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, wie sich die Expression von E-Cadherin auf Zellen innerhalb der Epidermis im Rahmen der Organkultur immunhistochemisch darstellen läßt und ob über den Beobachtungszeitraum von 48 Stunden, also während des Exodus epidermaler Langerhanszellen, Fluktuationen der E-Cadherin Expression nachweisbar sind. Das Motiv dieser Untersuchungen lag hierbei darin, das Verhalten der E-Cadherin Expression im Rahmen der Initiation der Langerhanszellemigration zu untersuchen und somit Aufschlüsse über die Interaktion zwischen Keratinozyt und Langerhanszelle zu erhalten. Gefrierschnitte und epidermale "sheets" der Zeitpunkte "null", "24" und "48 Stunden" wurden nach der Färbung mit dem gegen E-Cadherin gerichteten Antikörper (E-Cadherin, HECD-1, Maus IgG1, Takara Inc., Otsu, Japan) ausgewertet.

Ergebnis

Die immunhistochemische Darstellung der Expression von E-Cadherin in drei verschiedenen Experimenten zeigt in frischer, nicht kultivierter Haut eine zarte aber deutliche Färbung im gesamten epidermalen Interzellularraum. Die Intensität des Färbemusters ist über die gesamte Epidermis hinweg von gleichmäßigem Charakter. In der Dermis läßt sich E-Cadherin nicht nachweisen.

An diesem Ergebnis ändert sich auch nach 24 bzw. 48 Stunden der Organkultur nichts. Man findet weiters die retikulär-erscheinende Anfärbung des epidermalen Interzellularraumes in derselben Intensität wie zum Zeitpunkt "null Stunden". Auch die sorgfältige Untersuchung der Dermis liefert keine Hinweise auf E-Cadherin exprimierende Zellen. Eine Beurteilung der Expression dieses Moleküls auf Langerhanszellen ist in diesem System somit nicht möglich.

2. CD44-MOLEKÜL

Dieses weit verbreitete 90-kDa Glycoprotein (170) der Zelloberfläche scheint an einem weiten Spektrum immunologischer Funktionen beteiligt zu sein. So kann es unter anderem als kostimulierendes Signal in CD2 oder CD3-mediierter T-Zell Aktivierung und Zell-Proliferation (171,172) und als Promotor homotypischer T-Zell Adhäsion (173,174) fungieren. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Zelladhäsion an bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix (175) bzw. an sogenannte "high endothelial venules" (176). Dies ist im besonderen bei der Lymphozyten-Rezirkulation bzw. "homing" von Bedeutung.

Die differentielle Expression der *CD44 Isoformen* (177) in der Haut sollte mittels immunhistochemischer Methoden zur Darstellung gebracht werden und über den Verlauf von 48 Stunden Organkultur beobachtet werden um potentielle Veränderungen im Rahmen der Langerhanszellemigration feststellen zu können. Bezugnehmend auf eine Arbeit von Aiba et al. (178), die eine im Vergleich zu frisch gewonnenen Langerhanszellen höhere Expression von CD44 auf kultivierten Langerhanszellen auswies, sollte zudem das Augenmerk auf emigrierende Langerhanszellen gerichtet werden.

Ergebnis

Bei allen immunhistochemisch dargestellten CD44 Isoformen (CD44s,- 4v,- 6v,- 9v) zeigt sich eine *sehr intensive und gleichmäßige Färbung des gesamten epidermalen Interzellularraumes* und der Haarfollikel. Mit Ausnahme von CD44-4v lassen sich alle anderen Isoformen auch auf Schweißdrüsenepithel nachweisen. Die Dermis weist kein CD44 auf.

Nach 24 bzw. 48 Stunden Organkultur lassen sich in der Epidermis keine nennenswerten Abweichungen der Verteilung oder Intensität von CD44 erkennen: Sowohl Keratinozyten unkultivierter Haut als auch jene kultivierter Haut exprimieren in hohem Maße CD44. Inwieweit die Expression dieses Adhäsionsmoleküles an Emigrationsprozessen von Langerhanszellen beteiligt ist, läßt sich, zumindest anhand der immunhistochemischen Darstellungsweise, nicht genauer evaluieren. Emigrierende Langerhanszellen in der Dermis erscheinen CD44-negativ.

3. ALPHA-4 INTEGRIN

Im murinen System konnte gezeigt werden, daß kultivierte Langerhanszellen im Vergleich zu frisch isolierten Langerhanszellen eine starke Aufregulation an Alpha-4 Integrinen aufwiesen. Ein analoges Verhalten war auch bei *in vivo* aktivierten Langerhanszellen in der Epidermis sowie in den drainierenden Lymphknoten nach Hapten-Applikation beobachtbar (178). Auch humane Langerhanszellen erhöhen während der Kultur die VLA-4 Expression (A. Lenz, N. Romani, unveröffentlichte Beobachtung).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß VLA-4 im Rahmen der Migration von Langerhanszellen eine Rolle spielen könnte. Deshalb sollte die Expression von Alpha-4 Integrin auch im Organkultursystem über 48 Stunden untersucht werden.

Ergebnis

Frische, nicht kultivierte Haut zeigt in der Epidermis keine Expression von Alpha-4 Integrin. Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden der oben zitierten Arbeit von Aiba et al.. Jedoch ist im Verlauf der Organkultur keine Zunahme der Expression dieses Adhäsionsmoleküls - weder in der Epidermis, noch auf emigrierenden Langerhanszellen in der Dermis - zu bemerken. Entweder bleibt die Aufregulation des Integrins im Humansystem gänzlich aus, oder aber eine existente, jedoch möglicherweise sehr moderate Aufregulation bleibt infolge der, im Vergleich zur Fluoreszenz-Durchflußzytometrie (FACS) relativ wenig sensitiven immunhistochemischen Darstellung unentdeckt.

4. KUTANES LYMPHOZYTEN-ASSOZIIERTES ANTIGEN (CLA)

CLA, welches durch den monoklonalen Antikörper HECA-452 erkannt wird, spielt eine wichtige Rolle im Rahmen des, über die Bindung an E-Selektin dermalen mikrovasculärer Endothelzellen gebundenen "homings" bestimmter Gedächtnis T- Zellen in der Haut (179-182). In der Annahme, daß das "homing" verschiedener Leukozytenpopulationen in der Haut sich ähnlicher Mechanismen bedienen könnten, konnte für das Humansystem gezeigt werden, daß CD1a+ Langerhanszellen der Epidermis CLA in unterschiedlichem, aber generell eher schwachen Maße exprimieren (183). Unveröffentlichte Daten aus diesem Labor (A. Lenz, N. Romani) konnten zeigen, daß die Expression von CLA während der Kultur humaner Langerhanszellen verringert wird. Um mehr über eine mögliche Beteiligung dieses Adhäsionsmoleküls im Rahmen der Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis zu erfahren, sollte die Expression von CLA im Rahmen der Organkultur evaluiert werden.

Ergebnis

Frische, nicht kultivierte Haut zeigt lediglich in der papillären Dermis einige schwach CLA+ Zellen von runder Kontur, welche sich in der Nähe von kleinen Blutgefäßen befinden. Hierbei dürfte es sich um T-Lymphozyten handeln. In der Epidermis ist keine Expression von CLA ersichtlich.

Untersuchungen an Gefrierschnitten von Haut, die über 24 bzw. 48 Stunden kultiviert wurde, brachten dieselben Ergebnisse zutage. Eine Beteiligung von CLA im Rahmen der Emigration von Langerhanszellen erscheint deshalb als fraglich.

E. CHARAKTERISIERUNG EMIGRIERTER KUTANER DENDRITISCHER ZELLEN

Wie im Rahmen der vorangegangenen Kapitel dargestellt wurde, verlassen die epidermalen dendritischen Zellen i.e. Langerhanszellen im Verlaufe der Organkultur die Epidermis und erreichen, offensichtlich gemeinsam mit Zellen der Subpopulation dermalen dendritischer Zellen über die papilläre Dermis afferente Lymphgefäße. Innerhalb dieser akkumulieren sie in mehr oder weniger starkem Maße in Form traubenförmiger Zusammenballungen.

Prozesse der Migration sind jedoch während der Organkultur nicht ausschließlich auf die epidermo-dermale Junctionszone beschränkt, sondern finden auch an allen, dem Nährmedium zugewandten Grenzflächen der kultivierten Hautstücke statt. Diese Migration läßt sich indirekt dadurch feststellen, als daß am Boden der Kulturgefäße teilweise beachtliche Mengen von Zellen phasenkontrastmikroskopisch nachgewiesen werden können (siehe Abb.15.), die zum größten Teil aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie eindeutig den dendritischen Zellen zugeordnet werden können.

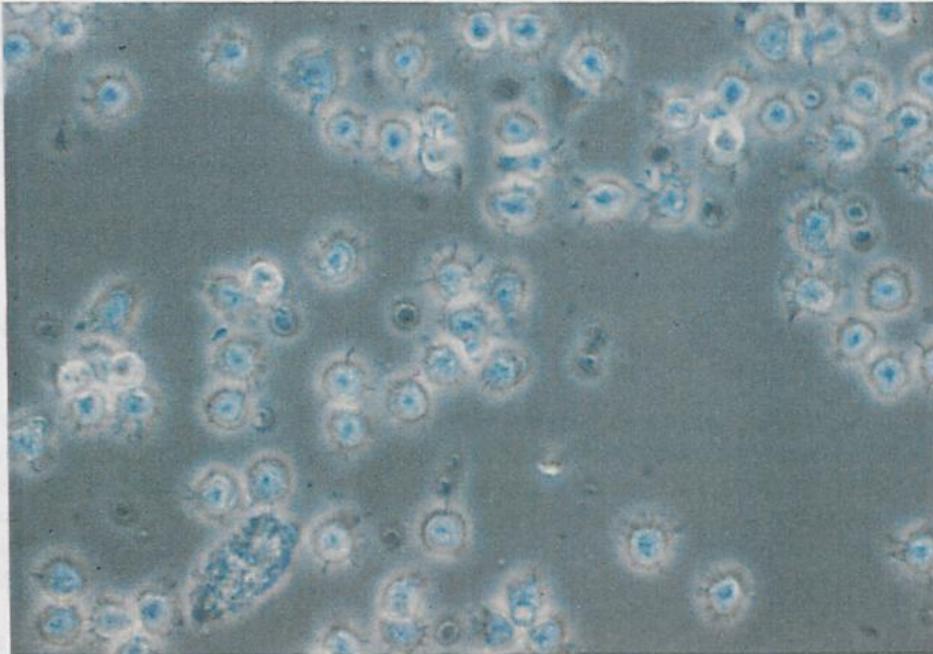


Abb.15. Phasenkontrastmikroskopie von emigrierten kutanen dendritischen Zellen am Boden des Kulturgefäßes. An der Oberfläche der Zellen erkennbar sind kurze Zytoplasmaausstülpungen bzw. kleine dendritische Fortsätze. (x400)

Es sind deutlich die ex-, und retrahierenden Bewegungen ihrer segelartigen Fortsätze ("veils") zu erkennen. Bei längerer Beobachtung sind ungerichtete, orientierungslos anmutende Lageveränderungen einzelner Zellen auszumachen. Gelegentlich stößt man auf dendritische Zellen, welche in der Tat ihrem Namen alle Ehre machen: so weisen diese einen eher polygonal geformten Zelleib auf, von welchem aus dünne Fortsätze von bisweilen beachtlicher Länge fortstreben. Von diesen Dendriten abgeschnürt erscheinen immer wieder kleinste vesikel-förmige Gebilde. Bei geduldiger Betrachtung sind tastende Bewegungen der Fortsätze zu bemerken, ohne daß die Zelle den Ort wechselte. Führt man zarte manuell induzierte Schaukelbewegungen der Kulturgefäße unter gleichzeitiger mikroskopischer Betrachtung durch, so zeigt sich, daß gerade solche Zellen mit langen Fortsätzen wie erstarrt am Boden der Gefäße verharren, während das Gros der restlichen dendritischen Zellen nicht adhärent ist. Manche der dendritischen Zellen

bilden Paare oder kleine Gruppen. Immer wieder kann man auch kleinere runde Zellen aufspüren, bei welchen es sich meist wohl um emigrierte T-Lymphozyten handeln dürfte, was die Ergebnisse der erst kürzlich publizierten Arbeit von Pope et al. bestätigt (39). Sie sind sowohl einzelstehend, als auch an dendritische Zellen gekoppelt anzutreffen. Letzteres Phänomen wird an der Mitbewegung der Lymphozyten mit den Bewegungen der dendritischen Zellen deutlich. Als weitere, allerdings in sehr bescheidenem Maße am Boden der Kulturgefäße vertretene Zellpopulation, sind noch einzelne Keratinozyten zu erwähnen.

Zur Verdeutlichung der immensen migratorischen Potenz dendritischer Zellen sei an dieser Stelle daran erinnert, daß diese Zellen, um überhaupt den Boden der Kulturgefäße erreichen zu können, de facto die künstliche Barriere eine Polycarbonat-Membran überwinden müssen. Diese Membran ist von Poren durchsetzt, welche einen Durchmesser von 3.0 µm (!) aufweisen. Hierbei sei erwähnt, daß der Durchmesser der dendritischen Zellen, wie sie am Boden der Kulturgefäße zu finden sind, etwa 12 µm beträgt.

Eine nähere, vor allem immunhistochemische Charakterisierung der Gesamtheit jener, im Rahmen der Organkultur emigrierter dendritischer Zellen, hatte sich demnach sowohl auf die in afferenten dermalen Lymphgefäßen akkumulierten Zellen, als auch auf jene am Boden der Kulturgefäße gefundenen dendritischen Zellen zu erstrecken. Von der Annahme ausgehend, daß es sich bei ersteren vorwiegend um dendritische Zellen epidermaler Provenienz i.e. Langerhanszellen handle, bei letzteren weitgehend um dermale dendritische Zellen (9), sollten potentielle Unterschiede im Marker-Profil der beiden "Zielpopulationen" ermittelt werden. Von besonderem Interesse war die Frage, ob dendritische Zellen im Zuge ihrer Emigration und unter den besonderen Einflüssen während der Organkultur auch Merkmale eines, dem System dendritischer Zellen attestierten Maturationsprozesses (siehe Kapitel "Einleitung") aufweisen würden.

Ausgewertet wurden immunhistochemische Färbungen dermalen Transversalschnitte von über 48 bzw. 72 Stunden kultivierter Haut sowie Zytozentrifugenpräparate. Als Referenz dienten Langerhanszellen unkultivierter Haut. Diese entsprechen sogenannten *unreifen* dendritischen Zellen.

1. IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

1.1. Expression von CD80/B7-BB1 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

Dem sowohl auf *reifen* humanen als auch murinen Langerhanszellen exprimierten B7-BB1 Molekül wird eine essentielle Bedeutung im Rahmen der Aktivierung primärer T-Zellen durch reife dendritische Zellen zugesprochen (85,86,144,184-186). B7-BB1 fungiert dabei abseits der obligaten Interaktion von T-Zellrezeptor/CD3-Komplex und den MHC-Antigenen auf der dendritischen Zelle als zusätzliches, kostimulatorisches Signal.

Ergebnis

Dendritische Zellen epidermaler Provenienz i.e. Langerhanszellen, aber auch dermale dendritische Zellen, welche in akkumulierter Form in den afferenten Lymphgefäßen der papillären Dermis aufgefunden wurden, zeigten in der Immunfluoreszenz dermalen Transversalschnitte einer über 48 bzw. 72 Stunden kultivierten Haut keine sicheren Anzeichen einer B7-BB1 Expression. Auch der Versuch des Nachweises des kostimulatorisch-wirkenden Moleküls auf dendritischen Zellen, welche vom Boden der Kulturgefäße eingesammelt wurden, blieb erfolglos. (n=3)

1.2. Expression von CD86/B7-2 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

Hierbei handelt es sich um ein weiteres T-Zell-kostimulatorisches Molekül, welches als zweiter Ligand für CD28 und CTLA-4 fungiert (150). Seine Expression auf dendritischen Zellen wird im Zuge deren Kultivierung aufreguliert (87,184) und darf somit als Anzeichen eines ablaufenden Reifungsprozesses aufgefaßt werden.

Ergebnis

Für die Expression von B7-2 auf im Rahmen der Organkultur emigrierten dendritischen Zellen gilt ähnliches wie für jene von B7-BB1. In der Immunfluoreszenz war keine sichere Ausprägung dieses Markers zu erkennen, weder auf emigrierten Langerhanszellen, noch auf dermal dendritischen Zellen. (n=3)

1.3. Expression von CD40 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

Es handelt sich hierbei um ein Adhäsionsmolekül, dessen Expression außer auf B-Lymphozyten auch auf reifen dendritischen Zellen nachweisbar ist (9,79). Seine Bedeutung wird im Zusammenhang mit der akzessorischen Funktion dendritischer Zellen gesehen.

Ergebnis

In den afferenten Lymphgefäßen der papillären Dermis akkumulierte dendritische Zellen i.e. Langerhanszellen und dermale dendritische Zellen erscheinen in der Immunfluoreszenz zu einem überragenden Teil CD40-negativ. Lediglich einige wenige Zellen erscheinen im Vergleich mit der Isotypkontrolle schwach positiv.

Analoge Verhältnisse treffen auf jene dendritischen Zellen zu, welche aus der Haut in das Nährmedium emigriert waren. Eine während der 48-stündigen Organkultur generell im Zuge des Auswanderungsprozesses initiierte und in der Folge gesteigerte Expression von CD40 darf, zumindest ausgehend von einer immunhistochemischen Bewertung, bezweifelt werden. (n=3)

1.4. Expression von CD83 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

CD83 ist ein Glycoprotein, welches auf der Zelloberfläche von bestimmten Subpopulationen des dendritischen Zellsystems (Langerhanszellen, interdigitierende Retikulumzellen) sowie aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird (151). In der Haut läßt sich HB15 auf einigen wenigen, in der Epidermis (Langerhanszellen) und in der Dermis gelegenen dendritischen Zellen detektieren. CD83 erscheint derzeit als einer der zuverlässigsten Marker für reife dendritische Zellen (173,174,187).

Ergebnis

Emigrierte dendritische Zellen, welche vom Boden der Kulturgefäße eingesammelt worden waren, waren in der Immunfluoreszenz eindeutig als HB15-positiv einzustufen. Die immunhistochemische Darstellung zeigt eine homogene Verteilung von HB15 auf der gesamten Zelloberfläche. Der Grad der Färbeintensität könnte als durchschnittlich bezeichnet werden, die interzelluläre Variabilität ist allgemein gering. (n=3)

Diese Befunde wurden von S. Ebner in unserem Labor mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie (FACS) bestätigt. Dies deutet sehr stark auf einen während der Organkultur ablaufenden Reifungsprozeß der Langerhanszellen hin..

1.5. Expression von TRAP (humaner CD40-Ligand) auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen (154)

Ergebnis

Der Versuch der immunhistochemischen Detektion des TRAP-Moleküls auf emigrierten dendritischen Zellen blieb in allen Experimenten erfolglos.

1.6. Einfluß von Zytokinen auf die Expression von CD80/B7-BB1, CD86/B7-2 und CD40 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

Nach jeweiliger Zugabe von TNF-alpha (100 U/ml), GM-CSF (800 U/ml) sowie Interleukin-1 alpha (100 U/ml) bzw. beta (100 U/ml) zum Nährmedium erfolgte die standardmäßige Durchführung einer Organkultur über 48 Stunden. Es sollte untersucht werden, ob die genannten Zytokine in der Lage sein würden, eine Aufregulation der Expression einiger sog. Reifungsmarker während der Emigrationsphase zu induzieren oder zu verstärken. Beachtung galt dabei vor allem GM-CSF, einem Zytokin, dem eine besondere Bedeutung im Rahmen der Langerhanszellreifung zugeschrieben wird (77,78,98).

Ergebnis

Keines der genannten Zytokine war dazu in der Lage, die Expression von CD80/B7-BB1, CD86/B7-2 bzw. CD40 auf emigrierenden bzw. emigrierten dendritischen Zellen in einem Maße zu steigern, als daß dies mit der zur Verfügung stehenden immunhistochemischen Methodik erkennbar wäre. Die Befunde entsprachen im wesentlichen jenen, wie sie bereits im klassischen Organkultursystem - ohne den Einsatz von Zytokinen - vorgefunden wurden.

2. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG

Im Anschluß an einzelne Organkulturen erfolgte fallweise eine funktionelle Charakterisierung von emigrierten dendritischen Zellen mit Hilfe der sogenannten "mixed leukocyte reaction" (MLR), wodurch ihre T-Zell stimulierende Kapazität und somit ihr funktioneller "Reifegrad" evaluiert werden sollte. Zu diesem Zweck wurden all jene dendritischen Zellen untersucht, welche im Rahmen der Organkultur die Haut bzw. die Epidermis verlassen hatten und sich am Boden der Kulturgefäße angesammelt hatten. Die hierbei erhobenen Daten sollten, nicht zuletzt aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten, im wesentlichen eine Orientierungshilfe darstellen. Vor allem aber galt es, im Zusammenhang mit Fragen der Langerhanszellreifung, Hinweise über die Sensitivität und Aussagekraft der in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Darstellungsweise zu gewinnen.

Ergebnis

Die ausgewanderten dendritischen Zellen stimulierten ruhende allogene T-Lymphozyten sehr effizient und entsprachen somit reifen kutanen dendritischen Zellen, wie sie von Pope et al. (39) sowie Lenz et al. (9) beschrieben wurden.

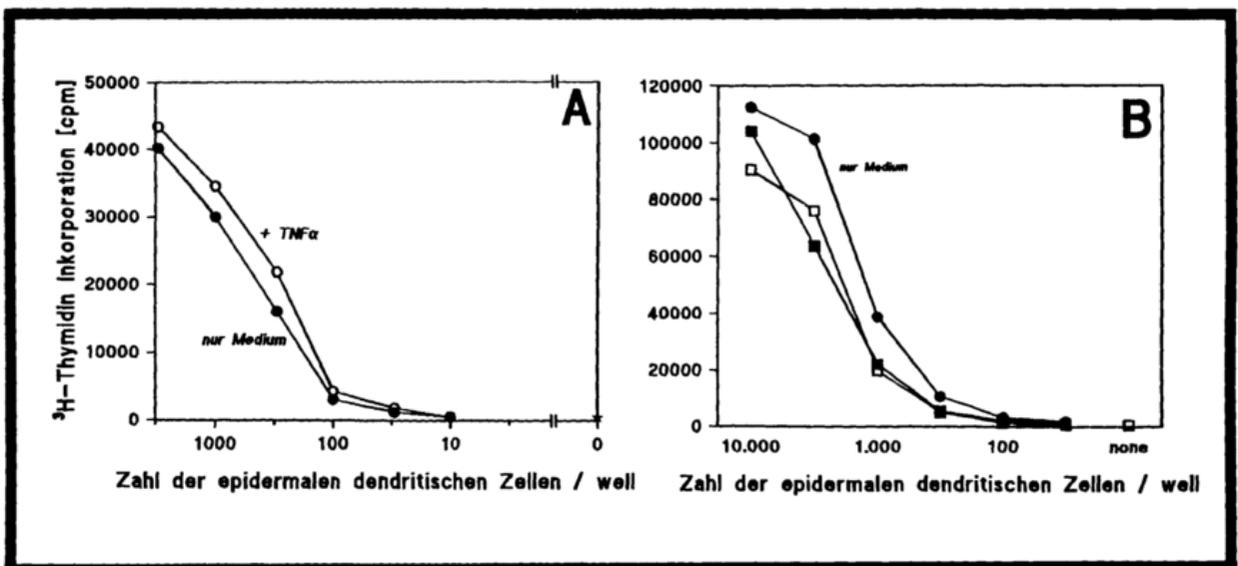


Abb.16. Die "Mixed leukocyte reaction" (MLR) zeigt eine gute immunstimulatorische Kapazität der, während der 48 stündigen Organkultur aus epidermalen "sheets" emigrierten Langerhanszellen.

IV. DISKUSSION

Epidermale Langerhanszellen sind wichtige Induktoren T-Zell-medierter Immunantworten. Infolge ihrer exponierten Position bekommen sie in vielen Fällen als erste Zellen des Immunsystems Kontakt zu Fremdanitigenen. Diese werden von ihnen aufgenommen, prozessiert und in weiterer Folge ruhenden T-Lymphozyten präsentiert. Dies impliziert eine Migration der Langerhanszellen von der Epidermis in die drainierenden Lymphknoten.

1. Eignung des Organkulturmodells zur Untersuchung der Migration humaner kutaner dendritischer Zellen

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, das Wanderungsverhalten humaner kutaner dendritischer Zellen in einem dafür adaptierten Organkultursystem unter verschiedenen, genau definierten Bedingungen zu untersuchen. Larsen et al. hatten beobachtet, daß dendritische Zellen im Anschluß an Transplantationen zu wandern begannen und versuchten die Reproduktion solcher Wanderungsprozesse auch in einem simplen Kultursystem (124). Und tatsächlich emigrierten große Mengen dendritischer Zellen aus kultivierter muriner Ohrhaut in das Nährmedium. Das gleichsam einfache wie effiziente Kultursystem wurde deshalb in seinen Grundsätzen auch für meine Studien übernommen, gleichwohl in leicht modifizierter Form.

Es galt zunächst zu klären, ob das von Larsen ursprünglich für das murine System konzipierte Organkultursystem auch für die Kultivierung humaner Haut geeignet sei und die in der Maus gewonnenen Erkenntnisse über die migratorische Fähigkeiten dendritischer Zellen *in vitro* auf die Verhältnisse im Humansystem übertragbar wären. Im Zuge dieser grundsätzlichen Evaluierung zeigte sich sehr bald, daß dies in der Tat der Fall ist. So konnte in zahlreichen Experimenten gezeigt werden, daß große Mengen epidermaler dendritischer Zellen i.e. Langerhanszellen die Epidermis im Zuge der 48-stündigen Kulturperiode verlassen. Die Emigrationsraten lagen im klassischen Kultursystem durchschnittlich bei 37% (31-46%) nach 24 Stunden bzw. 56% (46-66%) nach 48 Stunden, im sogenannten Epidermis-only System bei 49% (44-57%) respektive 82% (76-87%). Es konnte wiederholt beobachtet werden, daß das Ausmaß der Abwanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis nicht nur nennenswerte interindividuelle Differenzen, sondern bisweilen auch beachtliche intraindividuelle Abweichungen aufwies. Dieses Verhalten war in seiner Kausalität nicht schlüssig zu erklären, jedoch mehrten sich die Hinweise, daß die variable Dicke des dermalen Anteils der kultivierten Haut dafür verantwortlich sein könnte. Demnach könnte geschlossen werden, daß mit zunehmender Dicke der Dermis die Emigrationsleistung der Langerhanszellen abnehme. Gestützt werden konnte diese These außerdem retrograd durch die Auswertung zweier Experimente, bei welchen die üblicherweise durchgeführte Reduktion der Hautprobendicke durch ein Dermatom unterlassen worden war. Die in der Folge über einen Zeitraum von 48 Stunden kultivierte Haut wies unterdurchschnittliche epidermale Emigrationsraten auf (Daten nicht gezeigt). Demnach sind möglicherweise auch die primär als interindividuell-determiniert eingestuften Abweichungen letztendlich nur Artefakte, wie sie im Zuge der für die Kultur vorbereitenden technischen Aufbereitung der Hautexzidate oft unvermeidbar sind. Über die Zusammenhänge zwischen Dermisdicke und Emigrationsrate von Langerhanszellen im Organkultursystem läßt sich nur spekulieren. Theoretisch käme hierbei in Frage: (1) eine bei zunehmender Dermisdicke abnehmende Nährstoffversorgung der oberen Hautschichten insbesondere der Epidermis, welche in einer zumindest partiellen Beeinträchtigung der migratorischen Potenz resultieren könnte, (2) eine erschwerte Kontaktaufnahme dendritischer Zellen zu möglicherweise im Nährmedium enthaltenen oder von der traumatisierten Dermis dorthin abgegebenen chemotaktisch wirksamen Substanzen oder (3) eine, infolge der absenten Traumatisierung der papillären Dermis durch die Dermatomhandhabung fehlende oder reduzierte suspekthe chemotaktische oder andersartige Signalwirkung ausgehend von der (oberen) Dermis. Auch ein verstärkt die Auswanderung hemmender dermalen, und damit mit zunehmender Dermisdicke wachsender Einfluß könnte in die Emigration eingreifen. Vergleicht man die Emigrationsraten des klassischen Systems mit jenen des sogenannten Epidermis-only Systems, so wird deutlich, wie effizient die Migration in letzterem vonstatten geht. In diesem System, in welchem de facto ausschließlich eine Kultivierung des epidermalen

Kompartimentes erfolgt und funktionelle Interaktionen mit einer nicht existenten Dermis als Ursache einer Emigrationshemmung ausscheiden, scheint der aktive Exodus (eine passive "Emigration" durch Zerfall der kultivierten Epidermis konnte experimentell ausgeschlossen werden) von Langerhanszellen gleichsam enthemmt. Der Argumentation folgend, daß dies doch logisch erscheine, fehle doch in diesem System die zu überwindende mechanische Barriere der Basalmembranzone, so ist dies sicherlich zutreffend. Jedoch muß zu bedenken gegeben werden, daß sich dieser Umstand der Emigrationserleichterung letztendlich aber nur dann positiv auswirkt, wenn sich auch sehr viele Langerhanszellen aus ihrer angestammten suprabasalen Position "lösen" und den Weg in Richtung Basalmembran antreten. Es hat offenbar den Anschein, als ob im Rahmen der Epidermis-only Kultur nicht alleine emigrationserleichternde, sondern vielmehr auch vermehrt emigrationsinduzierende Signale an die Langerhanszellen herangetragen würden. Denn alleine ob des Fehlens des mechanischen Hindernisses der Basalmembran könnte man wohl keine gesteigerte sondern höchstens eine beschleunigte Emigration bei unveränderter Gesamt-emigrationsleistung erwarten. Die funktionellen Hintergründe der Emigration von Langerhanszellen und ihrer Kinetik dürften in beiden Systemen doch von einer komplexeren Unterschiedlichkeit sein, als dies vielleicht zunächst zu erwarten wäre.

2. Morphologische und phänotypische Veränderungen während der Migration

Ein weiterer wichtiger Schritt im Rahmen der grundsätzlichen Beurteilung des Organkultursystems war, neben der Erfassung emigrationskinetischer Eigenschaften von epidermalen Langerhanszellen, auch die immunhistochemische Darstellung des antigenen Profils kutaner dendritischer Zellen bzw. die Beschreibung etwaiger, im Zuge der 48-stündigen Kulturperiode auftretender Veränderungen in der Ausprägung und Verteilung bestimmter antigener Merkmale. Die Detektion kutaner dendritischer Zellen erfolgte zum Zwecke der Dokumentation ihrer Wanderung prinzipiell über die drei typischen Merkmale CD1a, HLA-DR und Birbeck-Granula. Die über CD1a dargestellte Morphologie der Langerhanszellen innerhalb der Epidermis veränderte sich im Zuge der Migration. Die ursprünglich zarten und weit ausgestreckten Dendriten schienen zunehmend kürzer und plumper, der Zelleib größer zu werden. Es ist anzunehmen, daß dieses Verhalten eine räumliche und funktionelle Umorientierung der Dendriten widerspiegelt. Hatten die Dendriten doch bisher die Aufgabe, auf die Haut einwirkende Antigene aufzugreifen, so liefern sie möglicherweise nun das für die Emigration notwendige Instrumentarium. Zudem rückten die meisten Zellen in die Nähe der Basalmembran und an manchen Stellen hatte man den Eindruck, als würden sie bereits den einen oder anderen plumpen Fortsatz in die papilläre Dermis vorstrecken. Prinzipiell konnte auf offensichtlich emigrierten Langerhanszellen zwar CD1a in unverändertem Maße nachgewiesen werden, jedoch ergab sich häufig eine Diskrepanz zwischen der numerischen Abnahme CD1a+ Zellen in der Epidermis und der analog dazu erwarteten Zunahme in der Dermis. Demgemäß ist zu folgern, daß die Expression von CD1a auf Langerhanszellen im Zuge der Emigration ab dem Erreichen der Dermis deutlich reduziert wird und dies zudem sehr rasch erfolgen muß, da CD1a in der oberen Dermis entweder stark oder überhaupt nicht nachweisbar war. Die Ergebnisse der Detektion von CD1-Antigen tragenden kutanen dendritischen Zellen zeigten somit weitestgehend Übereinstimmung mit früheren Befunden (79,82,188). Besonders interessant zu beobachten war die Expression von MHC Klasse II auf Langerhanszellen. Dieses, auf residenten Langerhanszellen deutlich nachweisbare Merkmal erfuhr bereits nach 24 Stunden Organkultur eine imposante Steigerung seiner Expression, die nach weiteren 24 Stunden ein Maximum erreichte. In diesem Zusammenhang konnte immer wiederkehrend beobachtet werden, daß offenbar jene Keratinozyten, welche sich in unmittelbarer Nähe von einzelnen oder gruppierten stark HLA-DR+ Langerhanszellen befanden, ebenfalls HLA-DR zu exprimieren schienen, wodurch optisch ein wabenartig-gefärbtes Keratinozytenmuster resultierte, welches die Langerhanszellen zu umgeben schien. Das Auftreten dieses Phänomens erscheint überraschend, denn die Expression von HLA-DR bzw. MHC Klasse II in der Epidermis gesunder Haut ist auf Langerhanszellen beschränkt (15). Bei zahlreichen pathologischen Veränderungen der Haut ist zwar häufig eine Expression von MHC Klasse II auf Keratinozyten anzutreffen (189), jedoch tritt dies in der Regel im Anschluß an das Auftreten eines dermalen T-Zell Infiltrates auf (190). Diese T-Zellen gelten auch als Quelle von Interferon Gamma, einem Lymphokin, welchem *in vitro* die Induktion von HLA-DR auf Keratinozyten zugeschrieben werden konnte (191-193). Welche funktionelle Bedeutung einer DR-Expression auf Keratinozyten im Rahmen der Organkultur zukommen könnte, ist nicht bekannt.

Epidermale Langerhanszellen sind *in situ* durch eine einzigartige zytoplasmatische Organelle, das Birbeck-Granulum, charakterisiert. Es wird vermutet, daß sie im Rahmen Rezeptor-mediierter Endozytose und folglich bei der intrazellulären Prozessierung von Antigenen von besonderer Bedeutung sind (194-198). In der über 48 Stunden kultivierten Haut konnten diese spezifischen Granula während der gesamten Kulturperiode in unverändertem Maße in Langerhanszellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Allerdings verschob sich der Ort der Nachweisbarkeit der Birbeck-Granula mit fortwährender Dauer der Kultur zunehmend in Richtung papillärer Dermis. Diese Beobachtung stand somit in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen von Arbeiten, die von einem allmählichen, jedoch nie vollständigem Verlust der Granula im Rahmen der Kultur frisch isolierter humaner Langerhanszellen sprechen (79,107). Anhand von Kryostatschnitten gelang der Nachweis Birbeck-Granula tragender Zellen in der papillären Dermis. Andererseits war dies ein erster sicherer Hinweis für eine tatsächlich stattfindende Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis. Einer mögliche Argumentation, die als Ursache des Verschwindens von Langerhanszellen in der Epidermis im Zuge der Organkultur nicht von einer Emigration, sondern lediglich von einem, aus welchen Gründen auch immer induzierten Verlust bestimmter immunhistochemisch darstellbarer Marker ausging, konnte somit widersprochen werden. Prinzipiell konnte also die Frage nach der Existenz einer Emigration epidermaler Langerhanszellen bejaht werden. Ergänzende Untersuchungen an dermalen Transversalschnitten bestätigten die ursprünglich an Längsschnitten erhobenen Befunde: Dermis frischer, nicht kultivierter Haut wies nur sehr wenige Birbeck-Granula tragende dendritische Zellen auf. Man kann davon ausgehen, daß es sich in diesem Falle um Langerhanszellen handelte, welche noch *in vivo* d.h. präoperativ die Epidermis verlassen hatten. Demgegenüber war nach 24 bzw. 48 Stunden eine stete Zunahme solcher Zellen in der papillären Dermis feststellbar, welche nur im Zuge der *in vitro*-Kultur dorthin gelangt sein konnten. Die Zahl der in der Dermis zu den definierten Zeitpunkten nachgewiesenen dendritischen Zellen epidermaler Provenienz korrelierte mit der zuvor an epidermalen "sheets" ermittelten Emigrationsraten.

Die immunhistochemischen Studien über die Emigration dendritischer Zellen vermochten vor allem anhand dermalen Transversalschnitte die Zusammenhänge zwischen Morphologie, Funktion und Lokalisation zu verdeutlichen. In der *Epidermis* wird ein überwiegender Teil des Zellvolumens dendritischer Zellen für die Ausbildung feinst verästelter Dendriten verwendet und auf diesem Weg die Wahrscheinlichkeit maximiert, in Kontakt mit Antigenen zu treten und diese "aufzufangen". Die Zelleiber erschienen deshalb vergleichsweise klein. Mit zunehmender Wanderungstendenz schienen die Zellen allmählich größer zu werden, was in erster Linie auf eine Umverteilung des Zytoplasmas infolge der Verkürzung der dendritischen Fortsätze zurückzuführen sein dürfte. Solche dendritischen Zellen mit relativ größer erscheinendem Zelleib und recht kurzen und plump wirkenden Dendriten fanden sich vorwiegend im Stratum basale der Epidermis, in der dermalen Junctionszone und in der oberen Dermis. Die Dendriten hatten möglicherweise einen Wandel ihrer funktionellen Bedeutung erfahren, wobei das "Auffangen" von Antigenen durch eine zunehmende Einbindung in Prozesse der Zellfortbewegung in den Hintergrund gedrängt wurden. Interessanterweise konnten in der Dermis zu keinem Zeitpunkt dendritischen Zellen mit auch nur annähernd so fein verzweigten Fortsätzen entdeckt werden, wie dies bei Langerhanszellen in der Epidermis zu beobachten war. Über die funktionelle Bedeutung der Subpopulation der sogenannten dermalen dendritischen Zellen ist bis dato recht wenig bekannt. Eine These spricht von einer möglichen zweiten Abwehrlinie hinter den epidermalen Langerhanszellen (9). Assoziiert man jedoch die Begriffe "Wachpostenfunktion" und "feinst verzweigte Dendriten", was zumindest auf die Langerhanszellen bezogen, legitim erscheint, so sprechen die von mir gemachten Beobachtungen zwar nicht grundsätzlich gegen diese These, lassen aber eine derartige Funktion weniger wahrscheinlich erscheinen. Noch größer und zudem nahezu kreisrund erschienen die Zelleiber emigrierender dendritischer Zellen erst, nachdem sie sich innerhalb der afferenten Lymphgefäße befanden. Dendritische Fortsätze fehlten völlig. Weder das "Tasten" nach Antigenen, noch aktives Wandern war zu diesem Zeitpunkt mehr notwendig, da *in vivo* nun der Lymphfluß das Erreichen der drainierenden Lymphknoten sichern würde.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Langerhanszellmigration im Organkultursystem war außerdem noch eine weitere dynamische Eigenschaft kutaner dendritischer Zellen von Interesse: die *funktionelle Maturation*. Dieser Reifungsprozeß, im Zuge dessen aus primär Antigen-präsentierenden Langerhanszellen in der Haut schließlich potente immunstimulatorische Zellen im Lymphknoten werden, ist durch eine Reihe phänotypischer Änderungen von Membrandeterminanten charakterisiert. Hierbei handelt es sich in erster Linie um eine Aufregulation solcher Strukturen, welche für eine immunologisch effektive

Interaktion mit den T-Zellen notwendig sind, wie beispielsweise die akzessorischen Moleküle B7-1, B7-2 und CD40 (82,85-87). Aus der Beobachtung des Expressionsverhaltens dieser Moleküle auf emigrierenden kutanen dendritischen Zellen sollte indirekt geschlossen werden, ob die im Rahmen der Organkultur auftretende Migration auch gleichzeitig von einer Maturation begleitet ist. Die dazu durchgeführten immunhistochemischen Studien ergaben, daß offenbar weder die kostimulatorischen Signale B7-1 und B7-2, noch CD40 auf den abwandernden dendritischen Zellen vermehrt exprimiert wurden. Auch die Zugabe von GM-CSF zum Nährmedium, jenem Zytokin, dem *in vitro* und möglicherweise auch *in vivo* die entscheidende maturationsregulierende Rolle zukommt (77,78,101,199) hatte keinerlei positiven Effekt. Aus diesen Ergebnissen, die im Widerspruch zu allen bisherigen Arbeiten und entsprechenden analogen Versuchen im murinen System (184) standen, erwuchs zunächst der Verdacht einer "Emigratio sine maturatione". Die Untersuchung der T-Zell stimulierenden Kapazität emigrierter kutaner dendritischer Zellen mittels der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) einerseits, und der eindeutige Nachweis der Expression von CD83 andererseits, widersprach jedoch dieser Hypothese deutlich. Entweder sind für eine effiziente Stimulation von T-Zellen durch kutane dendritische Zellen bereits sehr geringe - immunhistochemisch nicht mehr nachweisbare - Mengen an akzessorischen bzw. kostimulierenden Signalen ausreichend, oder aber es sind unbekannte technische Gründe für den erfolglosen Nachweis verantwortlich.

3. Migration via afferenter dermalen Lymphgefäße

Das verwendete Organkulturmodell hatte somit seine Prüfung als ein *in vitro*-Modell für die Emigration humaner Langerhanszellen bestanden. Dies war die Basis für die folgende Untersuchung einer zentralen Zielsetzung der vorliegenden Arbeit: dem *direkten* Nachweis, daß humane Langerhanszellen die Haut über die afferenten dermalen Lymphgefäße verlassen um schließlich in die drainierenden Lymphknoten zu gelangen. In der Maus war dies erstmals 1990 der Arbeitsgruppe um Christian P. Larsen (124) gelungen. Sie entdeckte im Anschluß an die Kultivierung *muriner* Ohrhaut in der Dermis charakteristische, strangförmige Zusammenlagerungen stark MHC Klasse II positiver Zellen. Aufgrund der typischen Anordnung der Zellen benannten sie die gefundenen Strukturen als "cords". Die Autoren verwiesen darauf, daß es sich dabei um emigrierte Langerhanszellen handle, welche sich in afferenten Lymphgefäßen befänden. Diese Ergebnisse konnten später durch die Arbeiten von M. Heine (200) sowie U. Ortner (161) reproduziert werden. Bisher gelang es nicht, derartige Akkumulationen emigrierter Langerhanszellen innerhalb der Dermis auch im Humansystem nachzuweisen. Dies war im wesentlichen auf folgende Umstände zurückzuführen: 1. Aufgrund der relativ zur Dermis muriner Ohrhaut um ein Vielfaches dickeren humanen Dermis ergaben sich Probleme bei der Durchführung und Auswertung immunhistochemischer Färbungen. 2. Humane Dermis enthält im Vergleich zu muriner eine Unmenge stark MHC Klasse II positiver Strukturen. Insbesondere die große Zahl HLA-DR+ dermalen Blutgefäße erschwerte das Auffinden der beschriebenen strangförmigen "cords" ungemein. Gelöst wurden die beiden Probleme zum einen dadurch, die jeweils zu explorierende Dermisdicke zu reduzieren, was durch die Entwicklung einer sequentiellen Dermisaufbereitung in Form von Transversalschnitten realisiert wurde sowie andererseits durch die Wahl eines anderen Suchantikörpers für dendritische Zellen. Alternativ zur MHC Klasse II, wenn nicht aufgrund seiner Spezifität für Langerhanszellen grundsätzlich überlegen, erwies sich der gegen die Birbeck-Granula der Langerhanszellen gerichtete monoklonale Antikörper LAG angesichts der bereits weiter oben beschriebenen Vorbefunde als optimal geeignet.

Unter Beachtung dieser Voraussetzungen konnte somit erstmals die Existenz sogenannter "cords" und somit der Weg emigrierender Langerhanszellen auch für das Humansystem direkt demonstriert werden. Untersuchungen an Semidünn-Schnitten sowie die Elektronenmikroskopie bestätigten den akkumulierten Zellen die Zugehörigkeit zum System dendritischer Zellen und bewiesen deren Lage im Lumen afferenter dermalen Lymphgefäße. Analoges konnte Heine im murinen System zeigen (200). Lediglich vereinzelt wurden auch T-Lymphozyten in den "cords" gefunden, deren migratorische Fähigkeit in Organkulturen erst jüngst beschrieben wurde (39).

Im Gegensatz zum murinen System ist jedoch im Humansystem die Häufigkeit dieses charakteristischen Ereignisses vergleichsweise nieder. Dies mag einerseits auf die im murinen System höheren Spontanemigrationsraten innerhalb von 48 Stunden zurückzuführen zu sein, andererseits könnte die Ursache dafür auch in einem stärker vernetzten dermalen Lymphgefäßsystem begründet sein, was bei der in allen Experimenten der genannten Autoren eingesetzten "sensiblen" Mäuseohrhaut nicht so unwahrscheinlich erscheint. Außerdem konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, daß die in den dermalen

Lymphgefäßen akkumulierten dendritischen Zellen offenbar keineswegs ausschließlich der Population epidermaler Langerhanszellen zuzurechnen sind, sondern, wenn auch nur zu einem kleineren Teil, sogenannte dermale dendritische Zellen repräsentieren. Dies war daraus zu schließen, weil in letzteren keine Langerhanszell-spezifischen Birbeck-Granula, gleichsam aber CD1a sowie eine hohe Expression von MHC Klasse II nachgewiesen werden konnte. Die Akkumulation dermalen dendritischer Zellen in afferenten dermalen Lymphgefäßen im Zuge der 48-stündigen Kultur dürfte allerdings nicht so zufällig stattfinden, wie dies auf den ersten Blick erscheinen mag. Denn die Auswertung von Experimenten, in denen ausschließlich Dermis kultiviert wurde (sog. "Dermis-only"-Kultur), brachte in keinem Falle jene typischen Akkumulationen dendritischer Zellen zutage, wie dies zuvor bei Vollhautkultur der Fall war. Daß jedoch trotzdem große Mengen dendritischer Zellen aus der kultivierten Dermis emigriert waren und es sich hierbei zweifelsohne zu einer überwältigenden Mehrheit eben um jene dermalen dendritischen Zellen handelte, bewies die phasenkontrastmikroskopische Betrachtung der Kulturgefäßböden sowie eine darauffolgende exemplarische immunhistochemische Studie. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Steuerung einer potentiellen Emigrationsfähigkeit dermalen dendritischer Zellen durch die Epidermis und/oder die emigrierenden epidermalen dendritischen Zellen i.e. Langerhanszellen hin. Offenbar handelt es sich hierbei um einen "emigrationslenkenden Effekt" hin zu den dermalen Lymphgefäßen, ohne den es solange zu einer orientierungslosen Wanderung dermalen dendritischer Zellen kommt, bis diese die Dermis an irgendeiner Stelle verlassen haben. Letztlich kann nicht beurteilt werden, ob die Abwanderung der dermalen dendritischen Zellen in die afferenten dermalen Lymphgefäße, wie sie im Organkultursystem darstellbar war, tatsächlich unter "realen" Verhältnissen *in vivo* stattfindet, oder es sich um ein sogenanntes "organkulturspezifisches Artefakt" handelt. Unter diesen Begriff ließe sich im übrigen wohl auch die Ursache für die direkte Nachweisbarkeit der Emigration kutaner dendritischer Zellen über die dermalen Lymphgefäße in Form der sog. "cords" einordnen. Denn eine derart dicht gelagerte Anhäufung von teilweise hunderten von Zellen in einem Lymphgefäß, in welchem *in vivo* ein steter Lymphfluß herrscht, dürfte hier deshalb nur schwerlich zustandekommen. Nichtsdestotrotz war gerade der fehlende Lymphfluß *in vitro* für die Darstellung des Emigrationsweges kutaner dendritischer Zellen außerordentlich hilfreich. Nicht zuletzt ausschlaggebend für die Demonstration der "cords" waren die im Organkultursystem hohen spontanen Emigrationsraten dendritischer Zellen, welche nicht dem natürlichen "turnover" *in vivo* entsprachen (25,201,202).

4. Stimulation der Migration

Welche aber sind die Mechanismen und Signale, die für die Initiierung und Steuerung der Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis verantwortlich sind? Die Untersuchung dieser bis heute noch wenig verstandenen Frage sollte im Bewußtsein dessen erfolgen, daß es sich bei dem verwendeten Organkultursystem hinsichtlich der Emigration der Langerhanszellen de facto um ein bereits aktiviertes System handelt.

4.1. Mechanisches Trauma

Als wahrscheinlichste These für die prinzipielle Ursache dieser Aktivierung dürfte die beträchtliche mechanische Alteration der Haut in Frage kommen, wie sie im Rahmen der Vorbereitung der Haut für die Einbringung in die Organkultur unvermeidlich ist. Neben der örtlich relativ begrenzten Zerstörung des epidermalen Zellverbandes erfuhr insbesondere die papilläre Dermis eine großflächige Traumatisierung in der Schnittebene des Dermatons. Grundsätzlich konnten die für eine Emigration der Langerhanszellen essentiellen Mechanismen entweder einerseits durch das epidermale Trauma oder andererseits durch das dermale Trauma oder womöglich durch beide parallel aktiviert worden sein. Geht man davon aus, daß traumagen induzierte und potentiell emigrationsstimulierende Signale für ihre Ausbreitung naturgemäß Zeit benötigen, so wäre bei einer ausschließlich durch epidermale Signale induzierten Emigration eine gewisse Abhängigkeit derselben von der Entfernung zum Ort des Traumas zu erwarten. Da aber immunhistochemische Studien epidermaler "sheets" keine beschleunigte Emigration randständiger und folglich traumanaher Langerhanszellen zeigen konnten bzw. vice versa kein verzögertes Emigrationsverhalten vergleichsweise traumaferner Langerhanszellen, ist zu schließen, daß bei der Kultur von Vollhaut vor allem Signale dermalen Provenienz für die ausgeprägte Emigration verantwortlich sein könnten. In diesem Fall würden emigrationsinduzierende Signale die Epidermis über ihre gesamte Fläche und gleichzeitig erreichen. Dies gilt entgegen einer flüchtigen ersten Einschätzung übrigens auch für die

"Epidermis-only"-Kultur. Allerdings ist in diesem speziellen Fall die Zeitspanne, während jener die epidermalen Langerhanszellen möglichen emigrationsfördernden Signalen aus der Dermis ausgesetzt sind, mit maximal 3 Stunden (Zeit zwischen Trauma und Abpräparation der Dermis) vergleichsweise kurz. In Anbetracht der, im Vergleich zur Vollhautkultur höheren Emigrationsraten scheint dies zunächst paradox. Möglicherweise aber ist eine kurze Zeitspanne für die Induktion der Emigration epidermaler dendritischer Zellen ohnehin völlig ausreichend ("Schalteneffekt"?). Nicht zuletzt kommt es bei der Vorbereitung der Haut für das "Epidermis-only" - System, der Trennung von Epidermis und Dermis, zu einer weiteren großflächigen, wenn auch stumpfen Traumatisierung, die möglicherweise entscheidend zu einer verstärkten Auswanderung der Langerhanszellen beitragen könnte. Traumatisierung bedeutet Zellzerstörung und damit die Freisetzung einer Vielzahl an bis zu diesem Zeitpunkt im Zellinneren geborgenen Substanzen. Als ein dementsprechend diffiziles und aufwendiges Unterfangen erweist sich der Versuch, bestimmten Substanzen emigrationsinitiierende oder emigrationsregulierende Wirkungen zuzuweisen. Im Rahmen der Möglichkeiten des Organkultursystems sollte deshalb beispielhaft versucht werden, den Ablauf bzw. das Ausmaß der Emigration der Langerhanszellen durch genau definierte exogene Einflußnahme auf chemischer, physikalischer oder biochemischer Ebene zu modulieren. Aus den Ergebnissen sollten schließlich indirekt Rückschlüsse auf die Mechanismen der Emigration gezogen werden.

4.2. Kontaktallergenapplikation

Zahlreiche Arbeiten wiesen auf die Bedeutung epikutan applizierter "kontaktsensibilisierender Substanzen" für die Initiation der Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis hin (114,125-127,130,203-206). Im Rahmen des Organkultursystems humaner Haut ließ sich einer derartiger Einfluß durch die kontaktsensibilisierende Substanz TNCB jedoch nicht klar eruieren. In einzelnen Experimenten konnte sogar ein leichter Rückgang der Emigration von Langerhanszellen registriert werden. Es wäre jedoch unzulässig, deshalb eine potentielle emigrationsinitiierende Potenz von TNCB grundsätzlich auszuschließen. Zumindest wird aber deutlich, daß sich die Emigration von Langerhanszellen in einem bereits suffizient aktivierten System wie jenem der Organkultur durch den additiven Stimulus von TNCB (in der verwendeten Konzentration) nicht weiter steigern läßt. Die in Einzelfällen bemerkte Abnahme der Emigrationsraten von Langerhanszellen könnte als eine Folge toxischer Beeinträchtigung des sensiblen migratorischen Apparates interpretiert werden. Eine fortführende detaillierte Evaluation der Wirkung unterschiedlicher Arbeitskonzentrationen von TNCB (unter einem Prozent) lag nicht in der Aufgabenstellung dieser Arbeit. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise niedrigere TNCB-Konzentrationen, für welche im übrigen eine sensibilisierende Wirkung nachgewiesen ist (207), durchaus einen emigrationsfördernden Einfluß haben könnten.

4.3. Zytokine

Welches Zytokin bzw. welche Kombination an der Initiation und Amplifikation der Emigration von Langerhanszellen *in vivo* beteiligt sind, ist heute im Detail noch nicht geklärt. Immer deutlicher zeichnet sich jedoch dabei eine zentrale Bedeutung von TNF-alpha ab (208,209). Diese Einschätzung konnte in meinen Studien insofern bekräftigt werden, als daß TNF-alpha, nicht aber GM-CSF oder Interleukin-1 alpha bzw. beta, dazu in der Lage war, die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis um 6 - 17% gegenüber der Kontrolle zu steigern. Ob und welche Bedeutung den anderen aufgeführten Zytokinen bei der Initiation des Emigrationsprozesses zukommt, ließ sich anhand des Organkultursystems nicht feststellen. Während beispielsweise das Fehlen eines emigrationsfördernden Effektes durch GM-CSF weniger überraschte, so interessant erschien das Ausbleiben einer Emigrationssteigerung durch Interleukin-1 beta. Denn verschiedene Arbeiten (138,210-214) geben Grund zu der Annahme, daß von Langerhanszellen nach Antigenkontakt selbst freigesetztes Interleukin-1 beta, auf parakrine Weise die umliegenden Keratinozyten zur Synthese und Sekretion von TNF-alpha anregt, welches nun direkt, möglicherweise vermittelt über Proteinkinase C (215) die Emigration der Langerhanszellen induzieren könnte (211,216). Unter der Annahme der Richtigkeit dieser Hypothese erscheint die fehlende Steigerungsfähigkeit der Emigration im Organkultursystem durch Interleukin-1 beta unklar. Möglicherweise sind hierbei Besonderheiten im Bereich der Signalübertragung von der Langerhanszelle über Interleukin-1 beta zum Keratinozyten verantwortlich, wie etwa eine Dosisunabhängigkeit, kompetitive Hemmeffekte oder unbekannte Fluktuationen der Interleukin-1 Rezeptorexpression auf der Keratinozytenoberfläche. Auch

eine limitierte oder erschöpfte TNF-alpha Produktion der Keratinozyten wäre vorstellbar, nachdem im Anschluß an die massive initiale Traumatisierung der Haut vielleicht bereits hohe Mengen an Interleukin-1 beta freigesetzt wurden oder aber die Belastbarkeit der Keratinozyten in bezug auf die Produktion und Freisetzung von TNF-alpha durch andere unbekannte Signale an ihre Grenze gebracht wurde. Im Gegensatz dazu könnte die dem Zytokin TNF-alpha zugeordnete emigrationsinitiiierende Signalwirkung insofern eine Dosisabhängigkeit zeigen, als daß entsprechend hohe Dosen von TNF-alpha möglicherweise zu einer beschleunigten Loslösung der einzelnen Langerhanszellen aus ihrer, wie auch immer gearteten Adhäsion an die Keratinozyten führen könnte (Phase 1, "Langerhanszellen in den Startlöchern"). Da die Emigration der Langerhanszellen prinzipiell über ihre Dichte in der Epidermis zu einem genau definierten Zeitpunkt gemessen wurde, resultiert eine solcherart beschleunigte Loslösung mit der in Folge einsetzenden migratorischen Bewegung (Phase 2, "Start") automatisch in einer erhöht erscheinenden Emigrationsrate. Für eine Dosisabhängigkeit des Initiierungsprozesses spricht zudem, daß offenbar sehr hohe Dosen von TNF-alpha (über 1000 U/ml) die Bereitschaft der Langerhanszellen zur Emigration deutlich einschränken (217). Ob dieser blockierende Effekt letztlich aber über denselben Signalweg zustandekommt wie die Stimulation oder ob es sich lediglich um das Resultat einer unspezifischen Toxizität handelt, konnte bisher nicht definitiv geklärt werden.

Die Bedeutsamkeit von TNF-alpha für die Initiation des Emigrationsprozesses konnte im übrigen durch die Blockade des Zytokins durch humanen anti-TNF-alpha verdeutlicht werden. Die hierbei ermittelten Emigrationsraten lagen sowohl im Standard-System als auch im sogenannten "Epidermis-only"-System um etwa 50% unter denjenigen der Kontrollen. Die gleichgewichtete Effizienz von anti-TNF-alpha in beiden Systemen impliziert demnach die Aktivierung analoger Signalwege. Zudem vermochten gleichzeitig verabreichte Überschüßdosen von TNF-alpha die emigrationshemmende Wirkung von anti-TNF-alpha zu antagonisieren. Ein analoges Verhalten von anti-TNF-alpha konnte auch mehrfach im murinen System im Zusammenhang mit Kontaktsensibilisierungsstudien demonstriert werden (218,219).

Weiters konnte in den Experimenten mit anti-TNF-alpha veranschaulicht werden, daß sich hierbei zwar die Emigration von epidermalen Langerhanszellen hemmen läßt, nicht aber die gleichfalls während der Organkultur stattfindende Abwanderung sogenannter dermaler dendritischer Zellen. Afferente dermale Lymphgefäße enthielten nach zweitägiger Organkultur unter Zusatz von anti-TNF-alpha, bezogen auf die Gesamtzahl dort akkumulierter dendritischer Zellen um durchschnittlich 50% weniger dendritische Zellen epidermaler Provenienz als in der Standardkultur ohne Zusätze. Entweder spielt TNF-alpha für die Ingangsetzung der Emigration der in der Dermis lokalisierten dendritischen Zellen nicht jene entscheidende Rolle wie in der Epidermis oder aber unbekannte Faktoren sind für die offenbare Unwirksamkeit von anti-TNF-alpha verantwortlich.

Ähnliche Versuche, in welchen ein lösliches TNF-Rezeptorprotein freien TNF-alpha in seiner Wirkung neutralisieren sollte, schlugen allerdings fehl. Möglicherweise war dieses Protein aber nicht funktionstüchtig. Eine diesbezügliche Evaluierung wurde nicht durchgeführt.

Im Hinblick auf eine künftige, präzisere *in vitro* Untersuchung fraglicher emigrationsinitiiierender Wirkungen bestimmter Zytokine - sowohl auf epidermaler als auch auf dermaler Ebene - wäre es wünschenswert, ließe sich die im Rahmen der Organkultur "spontan" einsetzende Emigration in einem möglichst hohen Maße hemmen, um in weiterer Folge gezielt durch Zytokine initiiert zu werden. Ein erster trivialer Ansatz bestand in der mehrstündigen Kühlung traumatisierter muriner Ohrhaut bei 4°C (161,217), wodurch sich in der Tat die Gesamtmigration partiell inhibieren und später über Zytokine (TNF-alpha, Interleukin-1 beta) restimulieren ließ. Als Ursache dafür wurde angenommen, daß die Wirkung sämtlicher traumatogen induzierter Signale, darunter potentielle emigrationsinitiiierende, über den Zeitraum der Temperaturabsenkung neutralisiert würden. Alle Versuche, einen derartigen Hemmeffekt auch im humanen Organkultursystem zu reproduzieren, scheiterten. Mehr noch, die Emigration kutaner dendritischer Zellen setzte sich auch nach Ende der "antiphlogistischen" Kühlphase fort, ohne daß hierfür exogene Stimulationsversuche über Zytokine notwendig gewesen wären. Dies läßt auf eine weiterhin wirksame emigrationsinitiiierende Signalwirkung schließen. Worin aber besteht der Unterschied zum murinen System? Angesichts der Hypothese von U. Ortner, wonach es während der Kühlphase gleichsam zu einer Neutralisierung der Wirkung u.a. emigrationsinitiiierender Zytokine käme, erscheint es unerklärlich, warum ein unspezifischer Einfluß wie Kälte nicht auch im Humansystem wirksam sein sollte. Eine mögliche Erklärung konnte in der Analyse der experimentellen Protokolle gefunden werden: Während die murine Ohrhaut bereits innerhalb der ersten Minuten im Anschluß an die Traumatisierung gekühlt werden konnte,

verstrichen im Humansystem aus organisatorischen Gründen durchschnittlich eineinhalb Stunden. Offensichtlich war der Emigrationsprozeß innerhalb dieser ersten posttraumatischen neunzig Minuten initiiert bzw. zumindest die "Information" zur Initiation (TNF-alpha?) an die Langerhanszellen weitergegeben worden. Die niedere Temperatur hätte in diesem Fall gewissermaßen lediglich als Bremse eines bereits "vorprogrammierten" Ablaufes fungiert. Bezugnehmend auf die Ergebnisse im murinen System entsteht der Eindruck, als wäre es den traumatogen induzierten Botenstoffen in der so kurzen Zeit bis zur Kühlung nicht gelungen, die Emigration der Langerhanszellen zu initiieren. Dies läßt wiederum darauf schließen, daß diese Botenstoffe zunächst eine größere räumliche Distanz zu überwinden hätten (von der Dermis in die Epidermis?) und/oder für die (finale) Initiierung der Langerhanszellemigration einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer Botenstoffe bedürfen.

5. Mechanismen der Emigration - Die Rolle von Adhäsionsmolekülen und Chemotaxis

Weitaus geringer als über potentielle emigrationsinitiierende Mechanismen wie beispielsweise Interleukin-1 beta oder TNF-alpha ist das Wissen über jene Abläufe, welche die Migration der dendritischen Zellen aus der Epidermis in die Dermis bzw. von hier in die afferenten Lymphgefäße regulieren.

Solche Regulative glaubt man unter anderem in bestimmten Adhäsionsmolekülen gefunden zu haben. So konnte gezeigt werden, daß sowohl Langerhanszellen als auch Keratinozyten das Adhäsionsmolekül E-Cadherin exprimieren (167,168). In einer möglicherweise zytokininduzierten uni-, oder bilateral verminderten Expression dieses Moleküls wird die Lösung der Langerhanszellen aus dem Keratinozytenverband und so die Voraussetzung für eine Emigration gesehen (220). Diesbezügliche Untersuchungen im humanen Organkultursystem bestätigten diese Hypothese zumindest dahingehend, als daß auf Langerhanszellen, welche die Epidermis verlassen hatten, immunhistochemisch kein E-Cadherin (mehr) nachweisbar war. Demgegenüber konnte in der Epidermis die Expression von E-Cadherin deutlich demonstriert werden. Daß hier aber die Expression über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden, sowohl die Intensität als auch die Lokalisation betreffend, nicht veränderte, erscheint widersprüchlich. Daraus könnte der Schluß gezogen werden, daß die für die Emigration essentielle Verminderung der Cadherin-Expression größtenteils oder ausschließlich seitens der Langerhanszellen realisiert wird. Die Tatsache einer gleichmäßigen und unveränderten epidermalen E-Cadherin Ausprägung weist zudem indirekt darauf hin, daß die immunhistochemische Darstellbarkeit und - daraus abgeleitet - die Quantität von E-Cadherin auf Langerhanszellen offensichtlich a priori weit niedriger ist als auf Keratinozyten. Aussagekräftigere Befunde zu diesem Problem könnten sensitivere Untersuchungsmethoden wie beispielsweise die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) liefern (220).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, dessen Expression in einem engen Zusammenhang mit der migratorischen Kapazität dendritischer, aber auch anderer Zellen gesehen wird, ist CD44 (221,222). Man nimmt an, daß eine hohe Expression dieses Adhäsionsmoleküls, wie dies etwa experimentell durch TNF-alpha induzierbar ist (101) ein hohes migratorisches Potential der entsprechenden Zelle signalisiert und umgekehrt auf migrationsträgen Zellen eine reduzierte Expression von CD44 feststellbar ist (221). Die Tatsache, daß ein derartiges Verhalten auf emigrierenden Langerhanszellen im humanen Organkultursystem nicht gefunden werden konnte, gibt Anlaß, an der obigen Anschauung zu zweifeln. Jedoch muß fairerweise zu bedenken gegeben werden, daß die fehlende Detektion einer sich verstärkenden CD44-Expression auf emigrierenden Langerhanszellen auch das Resultat einer unzureichend sensitiven Färbetechnik sein könnte.

Humane Langerhanszellen exprimieren an ihrer Oberfläche β 1-Integrine. Man geht davon aus, daß hierbei sogenannte "very late antigen"-Proteine (VLA) für die Adhäsion von Langerhanszellen an Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin (VLA-4) oder Laminin (VLA-6) verantwortlich sind (223,224). Seit bekannt wurde, daß die Expression von VLA-4 alpha auf murinen Langerhanszellen im Rahmen ihrer Kultivierung markant hinaufreguliert wurde und auch emigrierte dendritische Zellen, welche sich in den drainierenden Lymphknoten fanden, eine erhöhte Expression von VLA-4 alpha aufwiesen (178), gilt dieser Adhäsionsrezeptor als potentieller Regulator der Emigration epidermaler Langerhanszellen in die Lymphknoten. Die Untersuchung der Expression von VLA-4 alpha auf emigrierenden Langerhanszellen im humanen Organkultursystem konnten ein derartiges Geschehen nicht demonstrieren. Gleichfalls negativ fielen die Ergebnisse von Untersuchungen, VLA-4 betreffend, im murinen System aus, wie sie von Price et al. (225) durchgeführt wurden. Die potentielle emigrationsregulatorische Bedeutung von VLA-4 scheint deshalb zur Zeit fraglich.

Über das kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen (CLA) glaubte man ursprünglich, daß es aufgrund seiner Bindungsfähigkeit an E-Selektin dermalen Blutgefäßendothelien ausschließlich eine essentielle Rolle im sogenannten "homing" bestimmter T-Lymphozyten in der Haut spiele (181). Zahlreiche Studien identifizierten die Kohlenhydrate Lewis^x, Sialyl-Lewis sowie Sialyl-Lewis^x als Liganden für E-Selektin (ELAM-1) (226-228). In weiterer Folge stellte sich jedoch heraus, daß CLA auch auf Subpopulationen von dendritischen Zellen in der Epidermis und Dermis exprimiert wird (183,229). Die Ergebnisse dieser Studien wurden dahingehend interpretiert, daß CLA auch für das "homing" von Langerhanszellen in der Epidermis verantwortlich sein könnte, zumal Symington et al. (230) Sialyl-Lewis^x auch auf humanen epidermalen Keratinozyten nachweisen konnten. Umgekehrt läßt sich aus dieser Annahme ableiten, daß CLA später auch ein gewisser regulatorischer Effekt im Rahmen der Emigration von Langerhanszellen zukommen könnte. Diesbezügliche Untersuchungen im humanen Organkultursystem konnten zu sämtlichen Zeitpunkten im Verlauf der Kultur weder in der Epidermis, noch in der Dermis CLA-exprimierende Zellen nachweisen. Obgleich ein derartiger Befund nicht erwartet worden war, so stützt dieses Ergebnis doch die These, wonach CLA als ein Regulativ im Rahmen der Langerhanszellemigration fungieren könnte. In einer polytraumatisierten Haut, in der gleichsam "alle Zeichen auf Langerhanszellemigration stehen", erscheint es nicht verwunderlich, daß alle Signale und Mechanismen, welche eine ökonomische und dauerhafte Positionierung der Langerhanszellen (wie etwa ein CLA-mediiertes "homing") bewirken sollten, reduziert oder abgeschaltet werden. So auch CLA. Die Tatsache, daß selbst in der sogenannten frischen, nicht kultivierten Haut kein CLA mehr immunhistochemisch detektierbar war, könnte ein Hinweis für eine posttraumatisch äußerst rapide verlaufende Reduktion der Expression sein. Denn offenbar war für diesen Vorgang jenes eineinhalb bis zweistündige Zeitintervall zwischen der Traumatisierung und der ersten Befundung der Haut ausreichend.

Die These also, wonach die Positionierung der Langerhanszellen innerhalb des epidermalen Zellverbandes, deren Verbleib und letztlich deren Emigration die Folge einer fluktuierenden Expression eines oder mehrerer Adhäsionsmoleküle seien, erscheint durchaus legitim. Führt man sich allerdings vor Augen, daß eine alleinige Lösung dieser Interzellularkontakte nicht zwingend eine erhöhte migratorische Bereitschaft der Langerhanszellen, geschweisedenn eine gerichtete Emigration nach sich zieht, so stellt sich die Frage nach weiteren essentiellen Mechanismen. Eine entscheidende Rolle könnte hierbei der *Chemotaxis* zukommen. Verschiedenen Autoren gelang es bereits derartige Effekte *in vitro* zu zeigen. Humanes Fibroblasten-konditioniertes Medium (231) sowie bestimmte Formylpeptide bakteriellen Ursprungs, C5a, Monozyten Chemotaktisches Protein (MCP)-1 alpha/LD78 und MCP-3 (232) waren chemotaktisch wirksam und stimulierten die Migration dendritischer Zellen. Welche chemotaktischen Reize aber dendritische Zellen in der Haut rezeptieren und zu welchem Zeitpunkt ihres Lebenszyklus sie möglicherweise für welche Reize besonders empfänglich sind, ist heute noch völlig unbekannt. Vereinfacht stelle ich mir (spekulativ) dabei ein relativ unkompliziertes System vor, welches im wesentlichen auf folgenden Prämissen beruhen könnte: (1) einer *permanenten bidirektionalen "chemotaktischen Brücke"* (zwischen Dermis und Epidermis bzw. vice versa), (2) einer *permanenten migratorischen Aktivität* der Langerhanszellen sowie (3) einer *vom Reifegrad der Langerhanszellen abhängigen Sensitivität* für eine der beiden unter 1. aufgeführten chemotaktischen Reizquellen. Unter diesen Voraussetzungen sollte es möglich sein, daß aus dem Blut stammende Vorläuferzellen von Langerhanszellen von der Dermis in die Epidermis rekrutiert werden (Immigration), wobei der Ursprung des chemotaktischen Reizes etwa im Bereich des Stratum spinosum liegen könnte, da die Langerhanszellen bekanntlich eine suprabasale Position einnehmen. Das scheinbare Verharren der Langerhanszellen in der suprabasalen Epidermis könnte jedoch im Gegenteil einen permanenten Migrationsprozeß darstellen, der in Zusammenspiel mit Adhäsionsmolekülen ein Abdrängen der Langerhanszellen zum Stratum corneum hin durch die stete Proliferation der basalen Keratinozyten neutralisiert. Auch hierfür wäre noch derselbe chemotaktische Reiz ein adäquater. Durch den Kontakt der Langerhanszellen mit Kontaktallergenen induziert könnte es zu einer Verschiebung der Sensitivität weg vom suprabasalen chemotaktischen Reiz hin zu einem von der Dermis (Fibroblasten? Lymphgefäßendothel?) entsandten Signal kommen. Daraus würden letztlich die in dieser Arbeit beschriebenen Akkumulationen kutaner dendritischer Zellen in den afferenten dermalen Lymphgefäßen resultieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Eine herausragende Eigenschaft von dendritischen Zellen ist unter anderem ihre Fähigkeit, sich aktiv im Gewebe fortzubewegen (*migratorische Potenz*). Primär ermächtigt sie diese Fähigkeit dazu, das Blutgefäßsystem zu verlassen und die ihnen funktionell zugedachte Position in peripheren Geweben einzunehmen (*Immigration*). Letztlich aber garantiert erst wieder ihr Abwandern in umgekehrter Richtung (*Emigration*) die erfolgreiche Erfüllung ihrer immunologischen Aufgabe als Antigen-präsentierende Zelle.

Die Herausforderung der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Prozeß der Emigration *humaner* kutaner dendritischer Zellen (speziell der Langerhanszellen), ihre Regulation und die dabei möglicherweise involvierten Mechanismen *in vitro* zu untersuchen. Hierfür sollte ein *Organkulturmodell* zum Einsatz kommen, welches sich bereits im *murinen* System bewährt hatte.

Die Hypothese, wonach *humane* Langerhanszellen nach Antigen-Kontakt die Haut via afferente dermale Lymphgefäße verlassen, konnte in dieser Arbeit verifiziert werden. Die im Verlauf der Organkultur hohe "spontane" Emigration epidermaler Langerhanszellen korrelierte mit einer entsprechenden Zunahme der Langerhanszellzahl in der Dermis. Durch die adäquate Wahl von "Suchantikörpern" für diese Zellen, sowie durch die Einführung einer speziell entwickelten Dermisaufbereitungstechnik konnten für das Humansystem *erstmalig direkt* die Wege der Emigration kutaner dendritischer Zellen demonstriert und mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Außerdem wurde deutlich, daß nicht nur epidermale Langerhanszellen sondern auch Dermale Dendritische Zellen (DDC) die Haut auf diese Art und Weise verlassen.

Was die komplexe Frage betrifft, welche Zytokine bzw. Mechanismen diesen Emigrationsprozeß im Organkultursystem initiieren und regulieren, so wiesen insbesondere die Untersuchungen mit anti-TNF-alpha *indirekt* auf die emigrationsinduzierende Bedeutung von TNF-alpha hin.

Schließlich gelang es mittels phänotypischer und funktioneller Untersuchungen nachzuweisen, daß die emigrierten kutanen dendritischen Zellen im Zuge ihrer Wanderung einen Reifungsprozeß vollzogen hatten, der sie dazu befähigte, ruhende T-Lymphozyten zu stimulieren.

LITERATUR

1. Bergstresser, P. R., R. E. Tigelaar, J. H. Dees, and J. W. Streilein. 1983. Thy-1 antigen bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 81:286-288.
2. Romani, N., E. Tschachler, G. Schuler, W. Aberer, R. Ceredig, A. Elbe, K. Wolff, P. O. Fritsch, and G. Stingl. 1985. Morphological and phenotypical characterization of bone-marrow derived dendritic Thy-1-positive epidermal cells of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* 85:91s-95s.
3. Tschachler, E., G. Schuler, J. Hutterer, H. Leibl, K. Wolff, and G. Stingl. 1983. Expression of Thy-1 antigen by murine epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 81:282-285.
4. Stingl, G., K. C. Gunter, E. Tschachler, H. Yamada, R. I. Lechler, W. M. Yokoyama, G. Steiner, R. N. Germain, and E. M. Shevach. 1987. Thy-1+ dendritic epidermal cells belong to the T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2430-2435.
5. Romani, N., G. Stingl, E. Tschachler, M. D. Witmer, R. M. Steinman, E. M. Shevach, and G. Schuler. 1985. The Thy-1 bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J. Exp. Med.* 161:1368-1383.
6. Tschachler, E., N. Romani, G. Schuler, K. Wolff, and G. Stingl. 1986. Dendritic Thy-1-positive epidermal cells - a novel cell system within the mouse epidermis. In *Experimental and Clinical Photoimmunology*, Vol.3. R. A. Daynes and G. G. Krueger, editors. CRC Press,
7. Stingl, L. A., D. N. Sauder, M. Iijima, K. Wolff, H. Pehamberger, and G. Stingl. 1983. Mechanisms of UV-B induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells. *J. Immunol.* 130:1586-1591.
8. Steiner, G., F. Koning, A. Elbe, E. Tschachler, W. M. Yokoyama, E. M. Shevach, G. Stingl, and J. E. Coligan. 1988. Characterization of T cell receptors on resident murine dendritic epidermal T cells. *Eur. J. Immunol.* 18:1323-1328.
9. Lenz, A., M. Heine, G. Schuler, and N. Romani. 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 92:2587-2596.
10. Langerhans, P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch. [A]* 44:325-337.
11. Birbeck, M. S., A. S. Breathnach, and J. D. Overall. 1961. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cell) in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 37:51-64.
12. Klareskog, L., U. Malmnas-Tjernlund, U. Forsum, and P. A. Peterson. 1977. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268:248-250.
13. Stingl, G., E. C. Wolff-Schreiner, W. J. Pichler, F. Gschnait, and W. Knapp. 1977. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268:245-246.
14. Stingl, G., S. I. Katz, L. Clements, I. Green, and E. M. Shevach. 1978. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 121:2005-2013.
15. Stingl, G., K. Tamaki, and S. I. Katz. 1980. Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol. Rev.* 53:149-174.
16. Braathen, L. R. and E. Thorsby. 1980. Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scand. J. Immunol.* 11:401
17. Tsuchida, T., M. Iijima, H. Fujiwara, H. Pehamberger, G. M. Shearer, and S. I. Katz. 1984. Epidermal Langerhans cells can function as stimulatory cells but not as accessory cells in CTL induction. *J. Immunol.* 132:1163-1168.
18. Faure, M., A. Frappaz, D. Schmitt, C. Dezutter-Dambuyant, and J. Thivolet. 1984. Role of HLA-DR bearing Langerhans and epidermal indeterminate cells in the in vitro generation of alloreactive cytotoxic T cells in man. *Cell. Immunol.* 83:271-279.
19. Wolff, K. 1991. The fascinating story that began in 1868. In *Epidermal Langerhans Cells*. G. Schuler, editor. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. 1-21.
20. Stingl, G., N. Romani, and K. Wolff. 1987. Langerhans' cells: A distinctive member of bone marrow-derived dendritic cells. *Adv. Dermatol.* 2:269-282.
21. Wolff, K. and G. Stingl. 1983. The Langerhans Cell. *J. Invest. Dermatol.* 80:17s-21s.
22. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.

23. Pugh, C. W., G. G. MacPherson, and H. W. Steer. 1983. Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J. Exp. Med.* 157:1758-1779.
24. Steinman, R. M., D. S. Lustig, and Z. A. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* 139:1431-1445.
25. Katz, S. I., K. Tamaki, and D. H. Sachs. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326.
26. Inaba, K., M. Inaba, M. Deguchi, K. Hagi, R. Yasumizu, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3038-3042.
27. Barclay, A. N. and G. Mayrhofer. 1981. Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla of rat thymus. *J. Exp. Med.* 153:1666
28. Inaba, K., R. M. Steinman, M. W. Pack, H. Aya, M. Inaba, T. Sudo, S. Wolpe, and G. Schuler. 1992. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175:1157-1167.
29. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.
30. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.
31. Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83-93.
32. Schuler, G., N. Romani, H. Stössel, and K. Wolff. 1991. Structural organization and biological properties of Langerhans cells. In *Epidermal Langerhans cells*. G. Schuler, editor. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. 87-137.
33. Steinman, R. M., G. Schuler, N. Romani, and G. Kaplan. 1988. Dendritic Cells. In *Atlas of Blood Cells - Function and Pathology*, Vol.1. D. Zucker-Franklin, M. F. Greaves, C. E. Grossi, and A. M. Marmont, editors. Edi.Emes and Lea & Febiger, Milano, Philadelphia. 361-377.
34. Romani, N., P. Fritsch, and G. Schuler. 1991. Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In *Epidermal Langerhans Cells*. G. Schuler, editor. CRC Press, Boca Raton. 49-86.
35. Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, and J. M. Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509-519.
36. Romani, N., M. Witmer-Pack, M. Crowley, S. Koide, G. Schuler, K. Inaba, and R. M. Steinman. 1991. Langerhans cells as immature dendritic cells. In *Epidermal Langerhans cells*. G. Schuler, editor. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. 191-216.
37. Breathnach, S. M. 1991. Origin, cell lineage, ontogeny, tissue distribution and kinetics of Langerhans cells. In *Epidermal Langerhans Cells*. G. Schuler, editor. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. 23-47.
38. Nestle, F. O., X.-G. Zheng, C. B. Thompson, L. A. Turka, and B. J. Nickoloff. 1993. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* 151:6535-6545.
39. Pope, M., M. G. H. Betjes, H. Hirmand, L. Hoffman, and R. M. Steinman. 1995. Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distinctive dendritic-T-cell conjugates. *J. Invest. Dermatol.* 104:11-17.
40. Holt, P. G., M. A. Schon-Hegrad, and J. Oliver. 1988. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J. Exp. Med.* 167:262-274.
41. Rochester, C. L., E. M. Goodell, J. K. Stoltenborg, and W. E. Bowers. 1988. Dendritic cells from rat lung are potent accessory cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:121-128.
42. Sertl, K., T. Takemura, E. Tschachler, V. J. Ferrans, M. A. Kaliner, and E. M. Shevach. 1986. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J. Exp. Med.* 163:436-451.
43. Pollard, A. M. and M. F. Lipscomb. 1990. Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J. Exp. Med.* 172:159-167.



44. Nicod, L. P., M. F. Lipscomb, J. C. Weissler, C. R. Lyons, J. Alberton, and G. B. Toews. 1987. Mononuclear cells in human lung parenchyma: characterization of a potent accessory cell not obtained by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Dis.* 136:818-823.
45. Nicod, L. P., G. B. Toews, and J. C. Weissler. 1989. Separation of potent and poorly functional human lung accessory cells based on autofluorescence. *J. Leukocyte Biol.* 45:458-465.
46. Hart, D. N. J. and J. W. Fabre. 1981. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* 154:347-361.
47. Larsen, C. P., P. J. Morris, and J. M. Austyn. 1990. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J. Exp. Med.* 171:307-314.
48. Austyn, J. M., D. F. Hankins, C. P. Larsen, P. J. Morris, A. S. Rao, and J. A. Roake. 1994. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J. Immunol.* 152:2401-2410.
49. Klinkert, W. E. F., J. H. LaBadie, and W. E. Bowers. 1982. Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. *J. Exp. Med.* 156:1-19.
50. Lu, L., J. Woo, A. S. Rao, Y. Li, S. C. Watkins, S. Qian, T. E. Starzl, A. J. Demetris, and A. W. Thomson. 1994. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J. Exp. Med.* 179:1823-1834.
51. Hoefsmit, E. C. M., A. M. Duijvestijn, and E. W. A. Kamperdijk. 1982. Relation between Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiology* 161:255-265.
52. Pavli, P., C. E. Woodhams, W. F. Doe, and D. A. Hume. 1990. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology* 70:40-47.
53. Pavli, P., D. A. Hume, E. Van de Pol, and W. F. Doe. 1993. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. *Immunology* 78:132-141.
54. Knight, S. C., B. M. Balfour, J. O'Brien, L. Buttifant, T. Sumerska, and J. Clark. 1982. Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 12:1057-1060.
55. Drexhage, H. A., H. Mullink, J. de Groot, J. Clarke, and B. M. Balfour. 1979. A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cells. *Cell Tissue Res.* 202:407-430.
56. Mason, D. W., C. W. Pugh, and M. Webb. 1981. The rat mixed lymphocyte reaction: roles of a dendritic cell in intestinal lymph and T cell subsets defined by monoclonal antibodies. *Immunology* 44:75-87.
57. Rhodes, J. M. and R. Agger. 1987. Comparison of membrane antigens of mouse dendritic cell types. *Immunology letters* 16:981-997.
58. Bujdoso, R., J. Hopkins, B. M. Dutia, P. Young, and I. McConnell. 1989. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J. Exp. Med.* 170:1285-1302.
59. Young, J. W. and R. M. Steinman. 1988. Accessory cell requirements for the mixed-leukocyte reaction and polyclonal mitogens, as studied with a new technique for enriching blood dendritic cells. *Cell. Immunol.* 111:167-182.
60. Van Voorhis, W. C., R. M. Steinman, L. S. Hair, J. Luban, M. D. Witmer, S. Koide, and Z. A. Cohn. 1983. Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies, Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J. Exp. Med.* 158:126-145.
61. Nickloff, B. J., R. S. Mitra, K. Lee, L. A. Turka, J. Green, C. Thompson, and Y. Shimizu. 1993. Discordant expression of CD28 ligands, BB-1, and B7 on keratinocytes *in vitro* and psoriatic cells *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 142:1029-1040.
62. O'Doherty, U., R. M. Steinman, M. Peng, P. U. Cameron, S. Gezelter, I. Kopeloff, W. J. Swiggard, M. Pope, and N. Bhardwaj. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 178:1067-1078.
63. O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, and R. M. Steinman. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487-493.
64. Guillemot, F. P., P. D. Oliver, B. M. Peault, and N. M. LeDourain. 1984. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* 160:1803-1819.

65. Witmer, M. D. and R. M. Steinman. 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.* 170:465-481.
66. Dijkstra, C. D. 1982. Characterization of nonlymphoid cells in rat spleen, with special reference to strongly Ia-positive branched cells in T-cell areas. *J. Reticuloendothel. Soc.* 32:167-178.
67. Austyn, J. M., J. W. Kupiec-Weglinski, D. F. Hankins, and P. J. Morris. 1988. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen and binding within marginal zone. *J. Exp. Med.* 167:646-651.
68. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.
69. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139:380-397.
70. London, L. and J. P. McKeam. 1987. Activation and growth of colony-stimulating factor-dependent cell lines is cell cycle stage dependent. *J. Exp. Med.* 166:1419-1436?
71. Crowley, M. T., K. Inaba, M. D. Witmer-Pack, S. Gezelter, and R. M. Steinman. 1990. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J. Immunol. Methods* 133:55-66.
72. Romani, N., N. Bhardwaj, M. Pope, F. Koch, W. J. Swiggard, U. O'Doherty, M. D. Witmer-Pack, L. Hoffman, G. Schuler, K. Inaba, and R. M. Steinman. 1995. Dendritic Cells. In Handbook of Experimental Immunology. D. M. Weir, L. A. Herzenberg, and C. Blackwell, editors. Blackwell, Oxford.
73. Glass, C. K., O. V. Devary, and M. G. Rosenfeld. 1990. Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the a retinoic acid receptor. *Cell* 63:729-738.
74. Kraal, G., M. Breel, M. Janse, and G. Bruin. 1986. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163:981-997.
75. Metlay, J. P., M. D. Witmer-Pack, R. Agger, M. T. Crowley, D. Lawless, and R. M. Steinman. 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171:1753-1771.
76. Agger, R., M. T. Crowley, and M. D. Witmer-Pack. 1990. The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. *Int. Rev. Immunol.* 6:89-101.
77. Heufler, C., F. Koch, and G. Schuler. 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.* 167:700-705.
78. Witmer-Pack, M. D., W. Olivier, J. Valinsky, G. Schuler, and R. M. Steinman. 1987. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 166:1484-1498.
79. Romani, N., A. Lenz, H. Glassel, H. Stössel, U. Stanzl, O. Majdic, P. Fritsch, and G. Schuler. 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J. Invest. Dermatol.* 93:600-609.
80. Schuler, G. and R. M. Steinman. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161:526-546.
81. Shimada, S., S. W. Caughman, S. O. Sharrow, D. Stephany, and S. I. Katz. 1987. Enhanced antigen-presenting capacity of cultured Langerhans' cells is associated with markedly increased expression of Ia antigen. *J. Immunol.* 139:2551-2556.
82. Teunissen, M. B. M., J. Wormmeester, S. R. Krieg, P. J. Peters, I. M. C. Vogels, M. L. Kapsenberg, and J. D. Bos. 1990. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphological and phenotypical changes during in vitro culture. *J. Invest. Dermatol.* 94:166-173.
83. Witmer-Pack, M. D., J. Valinsky, W. Olivier, and R. M. Steinman. 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.* 90:387-394.
84. Tang, A. and M. C. Udey. 1991. Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low dose ultraviolet B radiation: Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD54) expression by murine Langerhans cells. *J. Immunol.* 146:3347-3355.
85. Larsen, C. P., S. C. Ritchie, T. C. Pearson, P. S. Linsley, and R. P. Lowry. 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.* 176:1215-1220.

86. Symington, F. W., W. Brady, and P. S. Linsley. 1993. Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 150:1286-1295.
87. Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. J. Hodes, and R. M. Steinman. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 180:1849-1860.
88. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L. L. Lanier, and J. Banchereau. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180:1841-1847.
89. Inaba, K., G. Schuler, M. D. Witmer, J. Valinski, B. Atassi, and R. M. Steinman. 1986. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164:605-613.
90. Inaba, K., N. Romani, and R. M. Steinman. 1989. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell-proliferative responses to dendritic cells. *J. Exp. Med.* 170:527-542.
91. Heufler, C., C. Humborg, R. M. Steinman, M. C. Nussenzweig, and G. Schuler. 1995. Molecular strategies to identify dendritic cell-specific molecules. In J. Banchereau, D. Schmitt, and L. Valette, editors. Plenum Press, New York.
92. Puré, E., K. Inaba, M. T. Crowley, L. Tardelli, M. D. Witmer-Pack, G. Ruberti, G. Fathman, and R. M. Steinman. 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.* 172:1459-1469.
93. Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A. M. Livingstone, C. G. Fathman, K. Inaba, and R. M. Steinman. 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.* 169:1169-1178.
94. Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley, and R. M. Steinman. 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J. Exp. Med.* 172:631-640.
95. Kämpgen, E., N. Koch, F. Koch, P. Stöger, C. Heufler, G. Schuler, and N. Romani. 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. Sci. USA* 88:3014-3018.
96. Roth, P. and E. R. Stanley. 1992. The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181:141-167.
97. Koide, S. L., K. Inaba, and R. M. Steinman. 1987. Interleukin-1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 165:515-530.
98. Koch, F., C. Heufler, E. Kämpgen, D. Schneeweiss, G. Böck, and G. Schuler. 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.* 171:159-171.
99. Inaba, K., M. D. Witmer-Pack, M. Inaba, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1988. The function of Ia⁺ dendritic cells and Ia⁻ dendritic cell precursors in thymocyte mitogenesis to lectin and lectin plus interleukin 1. *J. Exp. Med.* 167:149-162.
100. Zaghouani, H., R. Steinman, R. Nonacs, H. Shah, W. Gerhard, and C. Bona. 1993. Presentation of a viral T cell epitope expressed in the CDR3 region of a self immunoglobulin molecule. *Science* 259:224-227.
101. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.
102. Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Röllinghoff. 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:1595-1601.
103. Demetz, S., H. M. Grey, and A. Sette. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249:1028-1030.
104. Romani, N., K. Inaba, E. Pure, M. Crowley, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1989. A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulates DNA synthesis in mouse T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169:1153-1168.
105. Bhardwaj, N., J. W. Young, A. J. Nisnian, J. Baggers, and R. M. Steinman. 1993. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J. Exp. Med.* 178:633-642.

106. Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, and R. M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479-488.
107. Stössel, H., F. Koch, E. Kämpgen, P. Stöger, A. Lenz, C. Heufler, N. Romani, and G. Schuler. 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.* 172:1471-1482.
108. Kleijmeer, M. J., V. M. J. Oorschot, and H. J. Geuze. 1994. Human resident Langerhans cells display a lysosomal compartment enriched in MHC class II. *J. Invest. Dermatol.* 103:516-523.
109. Koch, F., B. Trockenbacher, E. Kämpgen, O. Grauer, H. Stössel, A. M. Livingstone, G. Schuler, and N. Romani. 1995. Antigen processing in populations of mature dendritic cells is caused by subsets of incompletely matured cells. *J. Immunol.* 155:93-100.
110. Brodsky, F. M. and L. E. Guagliardi. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 9:707-744.
111. Becker, D., A. B. Reske-Kunz, J. Knop, and K. Reske. 1991. Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized and expressed by mouse Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 21:1213
112. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-293.
113. Crowley, M., K. Inaba, and R. M. Steinman. 1990. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J. Exp. Med.* 172:383-386.
114. Macatonia, S. E., S. C. Knight, A. J. Edwards, S. Griffiths, and P. Fryer. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J. Exp. Med.* 166:1654-1667.
115. Hauser, C. 1990. Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 95:436-440.
116. Hauser, C. and S. I. Katz. 1988. Activation and expansion of hapten- and protein-specific T helper cells from nonsensitized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5625-5628.
117. Toews, G. B., P. R. Bergstresser, and J. W. Streilein. 1980. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124:445-453.
118. Streilein, J. W. 1989. Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: Evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J. Invest. Dermatol.* 93:443-448.
119. Tse, Y. and K. D. Cooper. 1990. Cutaneous dermal Ia⁺ cells are capable of initiating delayed type hypersensitivity responses. *J. Invest. Dermatol.* 94:267-272.
120. Koch, F., E. Kämpgen, B. Trockenbacher, C. Heufler, P. Stöger, N. Romani, and G. Schuler. 1992. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF 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(Abstr.)
121. Vermeer, M. and J. W. Streilein. 1990. Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7:258-265.
122. Barker, C. F. and R. E. Billingham. 1968. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J. Exp. Med.* 128:197-221.
123. Frey, J. R. and P. Wenk. 1957. Experimental studies on the pathogenesis of contact eczema in guinea pigs. *Arch. Allergy Appl. Immunol.* 11:81-100.
124. Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris, and J. M. Austyn. 1990. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* 172:1483-1493.
125. Bergstresser, P. R., G. B. Toews, and J. W. Streilein. 1980. Natural and perturbed distributions of Langerhans cells: Responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting, and dinitrofluorobenzene sensitization. *J. Invest. Dermatol.* 75:73-77.
126. Botham, P. A., N. J. Rattray, S. T. Walsh, and E. J. Riley. 1987. Control of the immune response to contact sensitizing chemicals by cutaneous antigen-presenting cells. *Br. J. Dermatol.* 117:1-9.
127. Weinlich, G., N. Sepp, F. Koch, G. Schuler, and N. Romani. 1990. Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogens / non-sensitizers. *Arch. Dermatol. Res.* 281:556(Abstr.)

128. Lenz, A., C. P. Larsen, J. M. Austyn, P. Fritsch, N. Romani, and G. Schuler. 1991. Human dermal dendritic cells: characterization by means of a novel isolation method. *Arch. Derm. Res.* in press (abstract):
129. Okamoto, H. and M. L. Kripke. 1987. Effector and suppressor circuits of the immune response are activated in vivo by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3841-3846.
130. Kripke, M. L., C. G. Munn, A. Jeevan, J.-M. Tang, and C. Bucana. 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* 145:2833-2838.
131. Inaba, K. and R. M. Steinman. 1986. Accessory cell-T lymphocyte interactions. Antigen-dependent and -independent clustering. *J. Exp. Med.* 163:247-261.
132. Freudenthal, P. S. and R. M. Steinman. 1990. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7698-7702.
133. Young, J. W., L. Koulova, S. A. Soergel, E. A. Clark, R. M. Steinman, and B. Dupont. 1992. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4⁺ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 90:229-237.
134. Crowley, M. T., K. Inaba, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118:108-125.
135. Rudensky, A. Y., P. Preston-Hurlburt, S. Hong, A. Barlow, and C. A. J. Janeway. 1993. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622
136. Valitutti, S., S. Müller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151.
137. Sauder, D. N., C. A. Dinarello, and V. B. Morhenn. 1984. Langerhans cell production of interleukin-1. *J. Invest. Dermatol.* 82:605-607.
138. Heufler, C., G. Topar, F. Koch, B. Trockenbacher, E. Kämpgen, N. Romani, and G. Schuler. 1992. Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: Interleukin 1b and macrophage inflammatory protein 1a are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J. Exp. Med.* 176:1221-1226.
139. Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler. 1996. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates TH1 development as well as Interferon-gamma production by TH1 cells. *Eur. J. Immunol.* (In Press)
140. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.-S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 154:5071-5079.
141. Steinman, R. M. and J. W. Young. 1991. Signals arising from antigen-presenting cells. *Current Opinion in Immunology* 3:361-372.
142. Mueller, D. L., M. K. Jenkins, and R. H. Schwartz. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann. Rev. Immunol.* 7:445-480.
143. June, C. H., J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, and C. B. Thompson. 1990. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* 11:211-216.
144. Koulova, L., E. A. Clark, G. Shu, and B. Dupont. 1991. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 173:759-762.
145. Galvin, F., G. J. Freeman, Z. Razi-Wolf, W. Hall, Jr., B. Benacerraf, L. Nadler, and H. Reiser. 1992. Murine B7 antigen provides a sufficient costimulatory signal for antigen-specific and MHC-restricted T cell activation. *J. Immunol.* 149:3802-3808.
146. Engel, P., J. G. Gribben, G. J. Freeman, L.-J. Zhou, Y. Nozawa, M. Abe, L. M. Nadler, H. Wakasa, and T. F. Tedder. 1994. The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen. *Blood* 84:1402-1407.
147. Lanier, L. L., S. O'Fallon, C. Somoza, J. H. Phillips, P. S. Linsley, K. Okumura, D. Ito, and M. Azuma. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154:97-105.

148. Enk, A. H. and S. I. Katz. 1994. Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells. *J. Immunol.* 152:3264-3270.
149. Kashihara, M., M. Ueda, Y. Horiguchi, F. Furukawa, M. Hanaoka, and S. Imamura. 1986. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 87:602-612.
150. Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and C. Somoza. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76-79.
151. Zhou, L.-J., R. Schwarting, H. M. Smith, and T. F. Tedder. 1992. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* 149:735-742.
152. Duijvestijn, A. M., E. Horst, S. T. Pals, B. N. Rouse, A. C. Steere, L. J. Picker, C. J. L. M. Meijer, and E. C. Butcher. 1988. High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *Amer. J. Pathol.* 130:147-155.
153. Schlingemann, R. O., G. M. Dingjan, J. J. Emeis, J. Blok, S. O. Warnaar, and D. J. Ruiter. 1985. Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium. *Lab. Invest.* 52:71-76.
154. Graf, D., U. Korthäuer, H. W. Mages, G. Senger, and R. A. Kroczeck. 1992. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur. J. Immunol.* 22:3191-3194.
155. Fithian, E., P. Kung, G. Goldstein, M. Rubenfeld, C. Fenoglio, and R. Edelson. 1981. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2541-2544.
156. Murphy, G. F., S. Sato, A. K. Bhan, T. Harist, and M. C. Mihm. 1981. Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab. Invest.* 45:465
157. Rowden, G. 1977. Immuno-electron microscopic studies of surface receptors and antigens of human Langerhans cells. *Br. J. Dermatol.* 97:593-608.
158. Ryan, T. J. 1989. Structure and function of lymphatics. *J. Invest. Dermatol. Supplement*:18S-24S.
159. Sauter, B., K. Wolff, and K. Rappersberger. 1995. Histogenesis of Kaposi sarcoma. Immunomorphological comparison with endothelial cells from normal skin, cutaneous hemangiomas, and lymphangiomas. *Am. J. Pathol.* (In Press)
160. Luger, T. A. and T. Schwarz. 1991. Epidermal cell derived secretory regulins. In *Epidermal Langerhans Cells*. G. Schuler, editor. CRC Press, Boca Raton. 217-251.
161. Ortner, U. 1994. Modulation und Migration von Langerhanszellen in vitro und in vivo / Modulation and migration of Langerhans cells in vitro and in vivo. 1 p.
162. Tracey, K. J., H. W. Kirk, K. R. Manogue, Y. Fong, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, G. C. Kuo, B. Beutler, R. S. Cotran, A. Cerami, and S. F. Lowry. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J. Exp. Med.* 167:1211-1227.
163. Mohler, K. M., D. S. Torrance, C. A. Smith, R. G. Goodwin, K. E. Stremmler, V. P. Fung, H. Madani, and M. B. Widmer. 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* 151:1548-1561.
164. Carter, D. B., M. R. Deibel, Jr., C. J. Dunn, C. C. Tomich, A. L. Laborde, J. L. Slightom, A. E. Berger, M. J. Bienkowski, F. F. Sun, R. N. McEwan, P. K. W. Harris, A. W. Yem, G. A. Waszak, J. G. Chosay, L. C. Sieu, M. M. Hardee, H. A. Zurcher-Neely, I. M. Reardon, R. L. Heinrikson, S. E. Truesdell, J. A. Shelley, T. E. Eessalu, B. M. Taylor, and D. E. Tracey. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344:633-638.
165. Takeichi, M. 1990. Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 59:237-252.
166. Lewis, J. E., P. J. Jensen, and M. J. Wheelock. 1994. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J. Invest. Dermatol.* 102:870-877.
167. Tang, A., M. Amagai, L. G. Granger, J. R. Stanley, and M. C. Udey. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82-85.
168. Blauvelt, A., S. I. Katz, and M. C. Udey. 1995. Human Langerhans cells express E-cadherin. *J. Invest. Dermatol.* 104:293-296.
169. Schwarzenberger, K. and M. C. Udey. 1995. Modulation of Langerhans cell E-cadherin expression during the initiation phase of contact sensitivity reactions. *J. Cell. Biochem.* 21A:14(Abstr.)

170. Pals, S. T., F. Hogervorst, G. D. Keizer, T. Thepen, E. Horst, and C. G. Figdor. 1989. Identification of a widely distributed 90-kDa glycoprotein that is homologous to the hermes-1 human lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143:851
171. Van Kooyk, Y., P. Van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, T. W. Kuijpers, and C. G. Figdor. 1989. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342:811-813.
172. Shimizu, Y., G. A. Van Severter, R. Siraganian, L. Wahl, and S. Shaw. 1989. Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* 143:2457-2463.
173. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* (In Press)
174. Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* (In Press)
175. Shimizu, Y. and S. Shaw. 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J.* 5:2292-2299.
176. Jalkanen, S., R. F. Bargatze, J. d. Toyos, and E. C. Butcher. 1987. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95 kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 105:983-991.
177. Mackay, C. R., H. J. Terpe, R. Stauder, W. L. Marston, H. Stark, and U. Günthert. 1993. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J. Cell. Biol.*
178. Aiba, S., S. Nakagawa, H. Ozawa, K. Miyake, H. Yagita, and H. Tagami. 1993. Up-regulation of $\alpha 4$ integrin on activated Langerhans cells: Analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes. *J. Invest. Dermatol.* 100:143-147.
179. Cruz, P. D., Jr., R. E. Tigelaar, and P. R. Bergstresser. 1990. Langerhans cells that migrate to skin after intravenous infusion regulate the induction of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 144:2486-2492.
180. Picker, L. J., J. R. Treer, B. Ferguson-Damell, P. A. Collins, P. R. Bergstresser, and L. W. M. M. Terstappen. 1993. Control of lymphocyte recirculation in man: II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J. Immunol.* 150:1122-1136.
181. Berg, E. L., T. Yoshino, L. S. Rott, M. K. Robinson, R. A. Warnock, T. K. Kishimoto, L. J. Picker, and E. C. Butcher. 1991. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 174:1461-1466.
182. Jalkanen, S., S. Saari, H. Kalimo, K. Lammintausta, E. Vainio, R. Leino, A. M. Duijvestijn, and K. Kalimo. 1990. Lymphocyte migration into the skin: The role of lymphocyte homing receptor (CD44) and endothelial cell antigen (HECA-452). *J. Invest. Dermatol.* 94:786-792.
183. Koszik, F., D. Strunk, I. Simonitsch, L. J. Picker, G. Stingl, and E. Payer. 1994. Expression of monoclonal antibody HECA-452-defined E-selectin ligands on Langerhans cells in normal and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.* 102:773-780.
184. Larsen, C. P., S. C. Ritchie, R. Hendrix, P. S. Linsley, K. S. Hathcock, R. J. Hodes, R. P. Lowry, and T. C. Pearson. 1994. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J. Immunol.* 152:5208-5219.
185. Hart, D. N. J., G. C. Starling, V. L. Calder, and N. S. Fernando. 1993. B7/BB-1 is a leucocyte differentiation antigen on human dendritic cells induced by activation. *Immunology* 79:616-620.
186. Linsley, P. S., W. Brady, M. Umes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174:561-569.
187. Zhou, L.-J. and T. F. Tedder. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154:3821-3835.
188. Furue, M., M. Nindl, K. Kawabe, K. Nakamura, Y. Ishibashi, and K. Sagawa. 1992. Epitopes for CD1a, CD1b, and CD1c antigens are differentially mapped on Langerhans cells, dermal dendritic cells, keratinocytes, and basement membrane zone in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27:419-426.
189. Auböck, J., N. Romani, G. Grubauer, and P. Fritsch. 1986. Expression of HLA-DR antigens on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br. J. Dermatol.* 114:456

190. Aiba, S. and H. Tagami. 1984. HLA-DR antigen expression on the keratinocyte surface in dermatoses characterized by lymphocytic exocytosis. *Br. J. Dermatol.* 111:285
191. Nickoloff, B. J., T. Y. Basham, and T. C. Merigan. 1985. Keratinocyte class II histocompatibility antigen expression. *Br. J. Dermatol.* 112:373
192. Basham, T. Y., B. J. Nickoloff, T. C. Merigan, and V. B. Morhenn. 1984. Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 83:88-90.
193. Auböck, J., D. Niederwieser, N. Romani, P. Fritsch, and C. Huber. 1985. Human interferon gamma induces expression of HLA-DR on keratinocytes and melanocytes. *Arch. Derm. Res.* 277:270-276.
194. Kolde, G. and J. Knop. 1987. Different cellular reaction patterns of epidermal Langerhans cells after application of contact sensitizing, toxic, and tolerogenic compounds. A comparative ultrastructural and morphometric time-course analysis. *J. Invest. Dermatol.* 89:19-23.
195. Hanau, D., M. Fabre, D. A. Schmitt, J.-L. Stampf, J.-C. Garaud, T. Bieber, E. Grosshans, C. Benezra, and J.-P. Cazenave. 1987. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD1 "NA1/34") surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the antigen. *J. Invest. Dermatol.* 89:172-177.
196. Hanau, D., M. Fabre, D. A. Schmitt, J.-C. Garaud, G. Pauly, M.-M. Tongio, S. Mayer, and J.-P. Cazenave. 1987. Human epidermal Langerhans cells cointernalize by receptor-mediated endocytosis "nonclassical" major histocompatibility complex class I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DRXantigens). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2901-2906.
197. Ray, A., D. Schmitt, C. Dezutter-Dambuyant, M.-C. Fargier, and J. Thivolet. 1989. Reappearance of CD1a antigenic sites after endocytosis on human Langerhans cells evidenced by immunogoldrelabeling. *J. Invest. Dermatol.* 92:217-224.
198. Bartosik, J. 1992. Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 99:53-58.
199. Heufler, C., F. Koch, D. Schneeweiss, and G. Schuler. 1988. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-1 (IL-1) mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 90:569(Abstr.)
200. Heine, M. 1993. Studien zur Funktion kutaner antigenpräsentierender Zellen mit Hilfe eines neuen Organkulturmodells / Studies on the function of cutaneous antigen presenting cells by means of a novel organ culture model. 1 p.
201. Chen, H., C. Ma, J. Yuan, Y. Wang, and W. K. Silvers. 1986. Occurrence of donor Langerhans cells in mouse and rat chimeras and their replacement in skin grafts. *J. Invest. Dermatol.* 86:630-633.
202. Holt, P. G., S. Haining, D. J. Nelson, and J. D. Sedgwick. 1994. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J. Immunol.* (In Press)
203. Knight, S. C., J. Krejci, M. Malkovsky, V. Colizzi, A. Gautam, and G. L. Asherson. 1985. The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. In vivo exposure to antigen. *Cell. Immunol.* 94:427-434.
204. Kinnaird, A., S. W. Peters, J. R. Foster, and I. Kimber. 1989. Dendritic cell accumulation in draining lymph nodes during the induction phase of contact allergy in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89:202-210.
205. Cumberbatch, M., S. J. Gould, S. W. Peters, and I. Kimber. 1991. MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: Possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. *Immunology* 74:414-419.
206. Silberberg, I. R., L. Baer, and S. A. Rosenthal. 1976. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* 66:210-217.
207. Kurimoto, I. and J. W. Streilein. 1993. Studies of contact hypersensitivity induction in mice with optimal sensitizing doses of hapten. *J. Invest. Dermatol.* 101:132-136.
208. Cumberbatch, M. and I. Kimber. 1992. Dermal tumour necrosis factor- α induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* 75:257-263.
209. Cumberbatch, M., I. Fielding, and I. Kimber. 1994. Modulation of epidermal Langerhans' cell frequency by tumour necrosis factor- α . *Immunology* 81:395-401.

210. Enk, A. H. and S. I. Katz. 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1398-1402.
211. Enk, A. H., V. L. Angeloni, M. C. Udey, and S. I. Katz. 1993. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1b in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* 150:3698-3704.
212. Matsue, H., P. D. Cruz, Jr., P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 1992. Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1b and MIP-1a among unstimulated mouse epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 99:537-541.
213. Schreiber, S., O. Kilgus, E. Payer, R. Kutil, A. Elbe, C. Mueller, and G. Stingl. 1992. Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J. Immunol.* 149:3525-3534.
214. Trede, N., R. S. Geha, and T. Chatila. 1991. Transcriptional activation of IL-1b and TNF-alpha genes by MHC class II ligands. *J. Immunol.* 146:2310
215. Halliday, G. M. and A. D. Lucas. 1993. Protein kinase C transduces the signal for Langerhans' cell migration from the epidermis. *Immunology* 79:621-626.
216. Cumberbatch, M. and I. Kimber. 1995. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 84:31-35.
217. Zanella, M. 1996. Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten: Einfluß von proinflammatorischen Zytokinen und Bakterienprodukten auf die Migration von murinen Langerhanszellen. 1 p.
218. Moodycliffe, A. M., I. Kimber, and M. Norval. 1992. The effect of ultraviolet B irradiation and urocanic acid isomers on dendritic cell migration. *Immunology* 77:394-399.
219. Cumberbatch, M., R. C. Scott, D. A. Basketter, R. J. Dearman, and I. Kimber. 1993. Influence of sodium lauryl sulphate on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced lymph node activation. *Toxicology* 77:181
220. Schwarzenberger, K. and M. C. Udey. 1996. In situ modulation of Langerhans cell E-cadherin expression by contact allergens and proinflammatory cytokines. *J. Invest. Dermatol.* (In Press)
221. Gabrilovich, D. I., G. M. Woods, S. Patterson, J. J. Harvey, and S. C. Knight. 1994. Retrovirus-induced immunosuppression via blocking of dendritic cell migration and down-regulation of adhesion molecules. *Immunology* 82:82-87.
222. Gunthert, U., M. Hofmann, and W. Rudy. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65:13
223. Le Varlet, B., C. Dezutter-Dambuyant, M. J. Staquet, P. Delorme, and D. Schmitt. 1991. Human epidermal Langerhans cells express integrins of the b1 subfamily. *J. Invest. Dermatol.* 96:518-522.
224. Le Varlet, B., M. J. Staquet, C. Dezutter-Dambuyant, P. Delorme, and D. Schmitt. 1992. In vitro adhesion of human epidermal Langerhans cells to laminin and fibronectin occurs through b1 integrin receptors. *J. Leukocyte Biol.* 51:415-420.
225. Price, A., I. Kimber, and A. Ager. 1995. The expression of VLA-4 and VLA-6 by Langerhans cells: their potential role in regulating Langerhans cell migration. *J. Invest. Dermatol.* 105:869(Abstr.)
226. Berg, E. L., M. K. Robinson, O. Mannson, E. C. Butcher, and J. Magnani. 1991. A carbohydrate domain common to both sialyl Le and sialyl Lewis X is recognized by the endothelial cell leukocyte molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266:14869
227. Larkin, M., T. J. Athern, M. S. Stoll, M. Shaffer, D. Sako, J. O'Brian, C. T. Yuen, A. M. Lawson, R. A. Childs, K. M. Barone, P. R. Langer-Safer, A. Hasegawa, M. Kiso, G. R. Larsen, and T. Feizi. 1992. Spectrum of sialylated and non sialylated fucopoligosaccharides bound by the endothelial leukocyte adhesion molecule E-Selectin. *J. Biol. Chem.* 267:13661
228. Phillips, M. L., E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, and J. C. Paulson. 1990. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl Lewis x. *Science* 250:1130
229. Yasaka, N., K. Nakamura, M. Furue, and K. Tamaki. 1995. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 105:865(Abstr.)
230. Symington, F. W., E. H. Holmes, and B. E. Symington. 1992. Human epidermal keratinocyte expression of sialyl-Lewis X. *J. Invest. Dermatol.* 99:601-607.
231. Kobayashi, Y., M.-J. Staquet, C. Dezutter-Dambuyant, and D. Schmitt. 1994. Development of motility of Langerhans cell through extracellular matrix by *in vitro* hapten contact. *Eur. J. Immunol.* 24:2254-2257.

232. Sozzani, S., F. Sallusto, W. Luini, D. Zhou, L. Piemonti, P. Allavena, J. van Damme, S. Valitutti, A. Lanzavecchia, and A. Mantovani. 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* 155:3292-3295.

