universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Regulation der Migration von murinen kutanen dendritischen Zellen durch bakteriell und Kontaktallergeninduzierte Zytokine

Stoitzner, Patrizia

1997

urn:nbn:at:at-ubi:2-12558

Regulation der Migration von murinen kutanen dendritischen Zellen durch bakteriell und Kontaktallergen-induzierte Zytokine

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Mag. rer. nat.
an der Leopold Franzens Universität Innsbruck

ausgeführt unter der Anleitung von
Doz. Dr. rer. nat. Nikolaus Romani
Institut für Dermatologie und Venerologie

eingereicht von
Patrizia Stoitzner
Innsbruck, Oktober 1997

UB Innsbruck
+C5513920X

Universitäts-Bibliothek • Innsbruck

1997:12 194

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Fritsch, der mir den Arbeitsplatz am Institut für Dermatologie und Venerologie zur Verfügung gestellt hat.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herr Doz. Dr. rer. nat. Nikolaus Romani, der mir dieses Diplomarbeitsthema bereitgestellt hat und mich während der ganzen Zeit mit Rat und Tat und viel Geduld unterstützt hat. Für die praktischen Tips und die Auflockerung des Laboralltages möchte ich mich herzlich bei Dr. phil. Franz Koch und MTA Katrin Janke sowie allen Mitarbeitern der Labors der Hautklinik bedanken.

Herrn Univ.-Doz. Dr. Kristian Pfaller danke ich für die Ideen und die Unterstützung bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie Frau Univ.-Prof. Dr. Margit Pavelka für die Ermöglichung dieser Arbeiten.

Weiters bedanke ich mich bei all meinen Freunden, die mir in der Zeit meines Studiums in allen Höhen und Tiefen beigestanden sind und mir gezeigt haben, daß zum richtigen Studieren viel mehr gehört als nur Lernen.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, meinen Geschwistern, meiner Großmutter und meinem Freund Tobias, da sie mich in jeglicher Hinsicht in meinem Vorhaben mit viel Geduld und Verständnis unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 1

1 Das System der dendritischen Zellen 1

1.1 Die Entdeckung 1

1.2 Herkunft und Vorkommen 1

1.3 Phänotyp der dendritischen Zellen 2

1.4 Funktionen der dendritischen Zellen 4

1.4.1 Wächterfunktion 4

1.4.2 Migratorische Funktion 4

1.4.3 Adjuvansfunktion 4

2 Die Haut als Immunorgan (*skin-associated lymphoid tissue*, SALT) 5

2.1 Aufbau der Haut 5

2.2 Die dendritischen Zellen der Haut 7

2.3 Zytokinproduktion in der Haut 7

2.3.1 Zytokinproduktion der Keratinozyten 8

2.3.2 Zytokinproduktion in Langerhanszellen 8

2.4 Beeinflussung der Wanderung kutaner dendritischer Zellen durch in der Haut gebildete Zytokine 9

3 Zielsetzung der Diplomarbeit 11

3.1 Optimierung der Organkultur 11

3.2 Einfluß der inflammatorischen Zytokine TNFα und IL-1β auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen 12

3.3 Lipopolysaccharide als Induktoren der Wanderung 12

3.4 Die Rolle von MIP-1α bei der Migration 13

3.5 IL-10 und IL-4 als inhibitorische Zytokine für kutane dendritische Zellen 13

3.6 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur 14

3.7 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen und der Haut nach der Organkultur 14

3.7.1 Immunfluoreszenz 15

3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie 15

B. Material und Methoden 16

1 Materialien, Zytokine, Antikörper, Geräte 16

1.1 Materialien 16

1.2 Zytokine 17

1.2.1 Zytokine für die Organkultur 17

1.2.2 Standards für Elisa 17

1.3 Antikörper 18

1.3.1 Antikörper für die Organkultur 18

1.3.2 Antikörper für Elisa 18
1.3.3 Antikörper für die Färbungen von *sheets* und Zytozentrifugationen 19
1.4 Geräte 20
2 Lösungen 21
2.1 Medium für die Organkultur 21
2.2 Lösungen für die Kultur epidermaler Zellsuspensionen 21
2.3 Lösungen zur Herstellung von epidermalen *sheets* 22
2.4 Lösungen für die Färbung epidermaler und dermaler *sheets* und der Zytozentrifugationen 22
2.5 Lösungen für Elisa 22
2.5.1 Lösungen für GM-CSF- und TNFα-Elisa 22
2.5.2 Lösungen für den IL-1β-Elisa 23
2.6 Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie 24
3 Methoden 25
3.1 Organkultur 25
3.2 Bestimmung der Zellzahl 25
3.3 Herstellung angereicherter Populationen epidermaler Langerhanszellen 26
3.3.1 Herstellung der Zellsuspension 26
3.3.2 Depletion eines Großteils der Keratinozyten 26
3.3.3 „Trypsin-Trick" 27
3.3.4 Kultur der epidermalen Zellsuspension 27
3.4 Herstellung epidermaler und dermaler *sheets* 27
3.5 Färbungen epidermaler *sheets* 28
3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung 28
3.5.2 Peroxidase-Färbung 28
3.6 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten 29
3.7 Färbungen von Zytozentrifugationen 29
3.8 Funktionelle Tests 30
3.9 Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) 30
3.9.1 Sandwich-Elisa für TNFα und GM-CSF 30
3.9.2 Sandwich-Elisa für IL-1β 32
3.10 Rasterelektronenmikroskopie (REM) 33
3.10.1 REM von epidermalen *sheets* und kompletter muriner Ohrhaut 33
3.10.2 REM der Zellkulturen 33

C. Ergebnisse 34

1 Optimierung der Organkultur 34
1.1 Änderung der Bedingungen während der Vorinkubation 34
1.2 Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite nach unten auf R10-Medium mit Zytokinen und Antikörpern 38
1.3 Zusammenfassung zur Optimierung der Organkultur 40

2 Untersuchungen zur Wanderung der Langerhanszellen 41
2.1 TNFα kann in der Organkultur die Migration der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen 41
2.1.1 Die TNFα-Wirkung ist dosisabhängig 41
2.1.2 Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen von TNFα 44
2.1.3 Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNFα in die Kultur hemmt die Migration der kutanen dendritischen Zellen 48
2.1.4 Morphologische Aspekte 51
2.2 Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der Langerhanszellen 54
2.2.1 Vorversuche von Koch und Janke 54
2.2.2 IL-1β wirkt in hoher Dosis in der Organkultur migrationsfördernd 56
2.2.3 Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1α und IL-1β in die Organkultur verhindert eine Migrationssteigerung 58
2.3 Kaskade 59
2.4 Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide wirken migrationsfördernd in der Organkultur: 62
2.5 Das Chemokin MIP-1α kann die Emigration von Langerhanszellen steigern 65
2.6 Test diverser Interleukine auf ihren Einfluß in der Organkultur 67
3 Untersuchung der Reifung von Langerhanszellen 71
3.1 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur 71
4 Ergebnisse zu den TNFα-, IL-1β- und GM-CSF-Elisas 76
4.1 TNFα-Zusatz in die Organkultur 76
3.2 IL-1β-Zusatz in der Organkultur 77
3.3 GM-CSF-Zusatz in die Organkultur 77
3.4 Lipopolysaccharide als Stimulator in der Organkultur 78
5 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen 79
5.1 Nachweis von zwei DC-Markern (In-1, 2A1) auf LC und dermalen dendritischen Zellen *in situ* und *in vitro* 79
6 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie 83
6.1 Untersuchung der Epidermis und Dermis 83
6.1.1 Kultur von Epidermis 83
6.1.2 Kultur von Ohrhaut 88
6.2 Untersuchung der aus der Epidermis und Dermis in 24 bzw. 48 Stunden emigrierten dendritischen Zellen und der in EC-Sus-pensionen gereiften Langerhanszellen 90

D. Diskussion 94

1 Optimierung der Organkultur 94
1.1 Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation der Mäuseohren bei +4°C 94

1.2 Vorinkubation der Ohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium 95
2 Exogenes TNFα kann in der Organkultur die Migration von kutanen dendritischen Zellen wesentlich beeinflussen 97
2.1 Die Wirkung von TNFα ist dosisabhängig 97
2.2 Die Migrationshemmung bei hohen Dosen TNFα ist nicht auf die Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen 99
2.3 Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern kann die migrationsfördernde Wirkung von TNFα aufgehoben werden 100
3 Exogenes IL-1 führt in der Organkultur zu einer Migrationssteigerung 101
3.1 IL-1 kann erst in hoher Dosis die Migration von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen 101
3.2 Neutralisierende Antikörper gegen IL-1 können die Migration von kutanen dendritischen Zellen hemmen 103
4 Gibt es eine Kaskade zwischen TNFα und IL-1 104
5 Bakterielle Bestandteile wie LPS können in der Organ-kultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern 107
6 Chemokine wie MIP-1α haben Einfluß auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen 108
7 IL-4 und IL-10 haben keinen Einfluß in der Organkultur 109
8 GM-CSF erhöht die Zellviabilität und beschleunigt die Reifung der kutanen dendritischen Zellen 111
9 Mögliches Zusammenspiel der Zytokine der Haut 112
10 Untersuchung der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Rasterelektronenmikroskopie 113
11 Kritik an der Organkultur 115

E. Zusammenfassung 117

F. Anhang 119

G. Referenzen 121

A. Einleitung

1 Das System der dendritischen Zellen:

1.1 Die Entdeckung:

Die dendritischen Zellen wurden erstmals 1974 von Steinman und Cohn an der Rockefeller University / New York in der Milz von Mäusen entdeckt (1). Anfangs wurden sie für spezialisierte Makrophagen gehalten und aufgrund ihres Aussehens als dendritische Zellen bezeichnet. Im Laufe der Jahre wurden sie als eigene Zellinie anerkannt, da sie zwar von einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle abstammen, sich dann jedoch getrennt von den Makrophagen weiterentwickeln (2).

1.2 Herkunft und Vorkommen:

Dendritische Zellen sind CD45-positive Leukozyten und entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. In der myeloiden Reihe entwickeln sie sich neben den Phagozyten und Granulozyten, wobei die genauen Entwicklungsstadien noch nicht bekannt sind (Abb. 1).

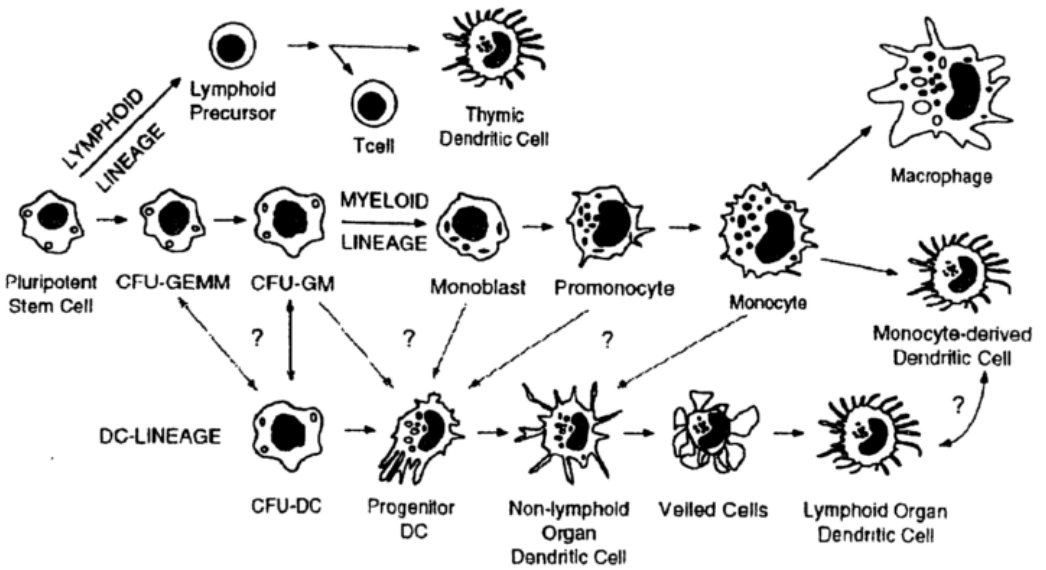


Abb. 1: Mögliche Abstammung und die Entwicklungsstadien von dendritischen Zellen (3).

Dendritische Zellen sind in beinahe allen Geweben zu finden, wobei sie je nach Lokalisation unterschiedliche Phänotypen ausbilden und verschiedene Funktionen erfüllen.

Übersicht über die Verteilung von dendritischen Zellen:

Tab. 1: Vorkommen der dendritischen Zellen im Gewebe

Kompartiment	Zellen	Lokalisation
nicht lymphatische Gewebe	Langerhanszellen dermale dendritische Zellen interstitielle dendritische Zellen	Epidermis, Schleimhäute Dermis Schleimhäute, Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm
Zirkulation	*„veiled cells"* dendritische Zellen	afferente Lymphe peripheres Blut
lymphatische Gewebe	interdigitierende Zellen marginale dendritische Zellen	T-Zell-Areale der sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Peyer´sche Plaques), Medulla des Thymus marginale Zone der Milz

1.3 Phänotyp der dendritischen Zellen:

Die aus dem Knochenmark stammenden Vorläufer der dendritischen Zellen wandern in verschiedene Gewebe und Organe. Diese „Gewebs-dendritischen Zellen" werden als **unreife dendritische Zellen** bezeichnet, da sie noch einige Monozyten/Makrophagen-Marker exprimieren. Zu diesen zählen der Fc- (CD32) und der Komplement-Rezeptor (iC3b, CD11b) (4), F4/80-Makrophagenantigen, Membran-ATPasen, unspezifische Esterasen (5), endogene Peroxidase und der Rezeptor für Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden Faktor (M-CSF, CD115) (6). Ein weiteres Kennzeichen der dendritischen Zellen ist eine konstitutive Expression von MHC-Klasse II, die im Laufe der Reifung verstärkt wird (7). Als Beispiele für unreife dendritische Zellen in nicht lymphatischen Geweben sind die Langerhanszellen der Epidermis, die dermalen dendritischen Zellen der Dermis und die interstitiellen dendritischen Zellen in Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm und Schleimhäuten zu nennen.

Auf bestimmte Stimuli, wie zum Beispiel Eindringen von Bakterien, Reizung durch Kontaktallergene etc., reagieren die unreifen dendritischen Zellen mit einer Wanderung via afferenter Lymphe in lymphatisches Gewebe. In dieser Phase werden sie als ***veiled cells*** bezeichnet, da sie im Zuge der Reifung lange, bewegliche, segelähnliche Zytoplasmafortsätze (*veils*) ausbilden.

Im Laufe dieser Migration entwickeln sie sich zu **reifen dendritischen Zellen**.

Nach dem Erreichen der sekundären lymphatischen Organe, wie zum Beispiel der Lymphknoten, werden sie auch als „lymphoide dendritische Zellen" bezeichnet. Die phänotypischen Veränderungen während der Reifung beruhen auf einer verstärkten Expression von MHC-Klasse II und einer erhöhten bzw. einer *de novo* Expression von Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel CD11c, ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), CD44v9. Weiters werden zur T-Zell-Aktivierung benötigte costimulatorische Moleküle, wie B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), vermehrt exprimiert. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion bzw. zu einem Verlust der vorher erwähnten Monozyten/Makrophagen-Marker (7, 8, 9).

Tab. 2: Der Phänotyp von residenten und kultivierten murinen Langerhanszellen (LC) im Vergleich zu lymphoiden dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen (7)

Marker	residente LC	kultivierte LC	Milz DC	Thymus DC	Makrophagen
Birbeck-Granula	+	-	-	-	-
Phagozytose	+	-	-	-	+++
MHC-Klasse I	+	++	++	++	+
MHC-Klasse II	++	+++	++	+++	±
F4/80	+	±	-	-	++
C3bi/CD11b	+	+	+	+	++
FcRII/CD32	+	±	-	±	++
NLDC-145[1]	+	+	-	+	-
33D1[2]	-	-	+	-	-
J11D[3]	+	+	-	+	-
IL-2 Rezeptor	-	+	±	+	-
ATPase	+	-	-	n.g.	+
nichtspezifische Esterase	+	-	-	n.g.	+
endogene Peroxidase	+	n.g.	-	n.g.	+
S-100	+	+	+	+	-

Legende: [1] ... Marker für interdigitierende Zellen in den Lymphknoten, Lektin-ähnlicher Rezeptor DEC-205 (10)

[2] ... klassischer DC-Marker in der Maus

[3] ... B-Zell-Marker, hitze-stabiles Antigen

+ ... vorhanden, ++/+++ ... mäßige/starke Zunahme, - ... nicht vorhanden

n.g. ... nicht getestet

1.4 Funktionen der dendritischen Zellen:

Die Aufgaben und Fähigkeiten der dendritischen Zellen sind vielfältig. Sie sind die wichtigsten Induktoren der Immunabwehr, da sie als einziger Zelltyp in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren. Die drei verschiedenen Funktionsbereiche von dendritischen Zellen sind räumlich wie auch zeitlich getrennt (11):

1.4.1 Wächterfunktion:

Die unreifen dendritischen Zellen in den nicht lymphatischen Geweben sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Endozytose dazu geeignet, fremde Antigene aufzunehmen und zu verarbeiten. Durch Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Aufnahme (12) können Moleküle, durch Phagozytose ganze Mikroorganismen (13) von den Zellen aufgenommen werden. In spezialisierten Organellen (endosomales-lysosomales System) findet die Zerlegung der Proteine in Peptide statt. Die prozessierten Peptide werden nach Koppelung an MHC-Moleküle an die Zelloberfläche weitergeleitet und dort T-Lymphozyten präsentiert.

1.4.2 Migratorische Funktion:

Um die MHC-Peptidkomplexe effektiv den T-Zellen präsentieren zu können, müssen die dendritischen Zellen an Orte wandern, an denen T-Zellen zahlreicher vorkommen als in den nicht lymphatischen Geweben. Dazu müssen sie von den Grenzflächen über die afferente Lymphe in die lymphatischen Organe emigrieren. Die für die Wanderung benötigten Adhäsionsmoleküle werden *de novo* oder verstärkt exprimiert und helfen den Zellen, an den Ort der Antigenpräsentation zu gelangen. Während der Wanderung verlieren sie die Fähigkeit, Antigene zu prozessieren, steigern jedoch ihre Antigenpräsentations- und T-Zell-Stimulationsfähigkeit durch Expression von costimulatorischen Molekülen (CD80, CD86).

1.4.3 Adjuvansfunktion:

Die dendritischen Zellen werden als Adjuvans der Natur (11,14) bezeichnet, da sie in der Lage sind, eine starke primäre Immunantwort auszulösen. In den T-Zell-Arealen von Milz und Lymphknoten ist die Wahrscheinlichkeit, einen passenden T-Zell-Klon

zu finden, am größten. In einer antigen-unabhängigen Weise nehmen die dendritischen Zellen über Adhäsine Kontakt zu den T-Zellen auf und gehen eine dauerhafte Bindung ein, wenn sie den passenden T-Zell-Rezeptor vorfinden (15,16). Dabei spielen wiederum die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LAF-3 und die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 eine wichtige Rolle. In den DC-T-Zell-Clustern kommt es zur T-Zell-Proliferation und zur Bildung von Zytokinen, welche die Immunantwort durch Aktivierung weiterer Zellen verstärken.

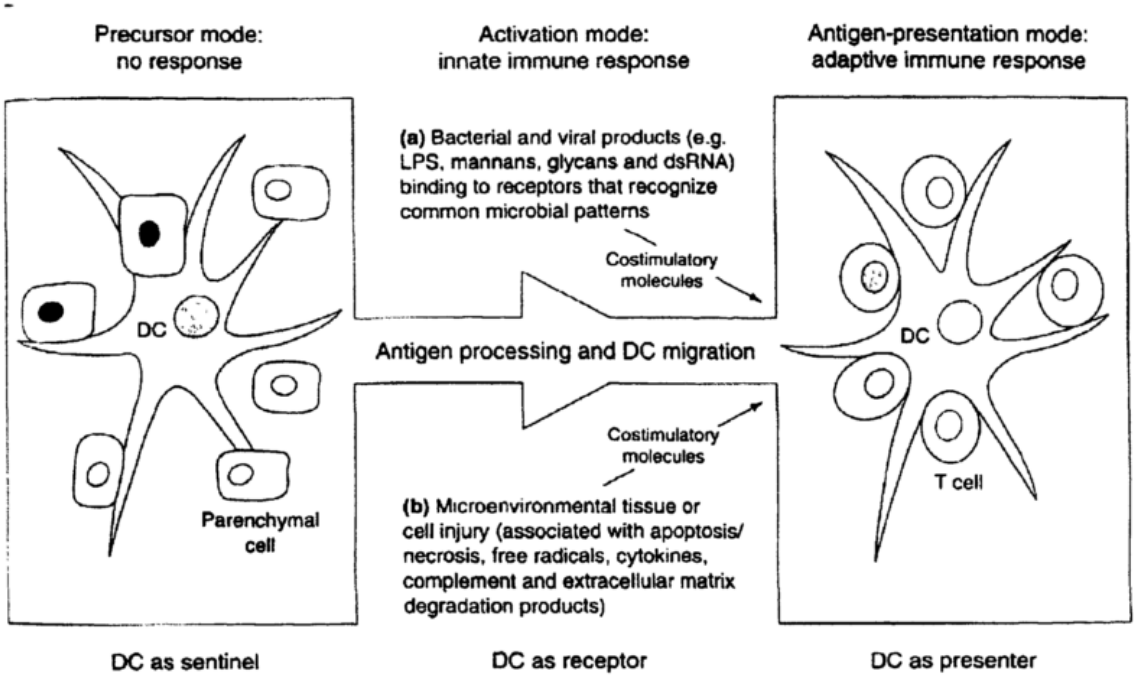


Abb. 2: Lebenslauf einer dendritischen Zelle (17)

2 Die Haut als Immunorgan (*skin-associated lymphoid tissue*, SALT (18)):

2.1 Aufbau der Haut:

Die Haut als Grenzfläche zur Umgebung hat vielfältige Aufgaben. Neben der Barrieren-Funktion gegen mechanische, chemische und thermische Noxen und gegen das Eindringen von Krankheitserregern dient sie der Temperaturregulierung, spielt eine Rolle bei der Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, fungiert als Sinnes- und Kommunikationsorgan und übernimmt nicht zuletzt sehr wichtige Aufgaben des Immunsystems.

Die **Oberhaut (Epidermis)** besteht aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel, das aus Keratinozyten aufgebaut ist. In den basalen Schichten zwischen den Epithelzellen befinden sich Melanozyten, die durch Pigmentbildung vor schädlichen UV-Strahlen schützen, Merkelsche Tastscheiben zur Sinneswahrnehmung und die Langerhanszellen, die eine Art Wächterfunktion im Rahmen der Immunabwehr einnehmen.

Die **Lederhaut (Dermis)** besteht aus einem dichten Kollagenfasergeflecht, in welches Blut- und Lymphgefäße, Nervenaufzweigungen und Nervenendkörperchen, Bindegewebszellen, Hautdrüsen und Haarwurzeln, sowie verschiedenste Immunzellen, wie dermale dendritische Zellen, Lymphozyten und Makrophagen, eingelagert sind.

Zwischen diesen zwei Hautschichten liegt die **Basalmembran**, über die Epidermis und Dermis durch Bindegewebspapillen und Zytoplasmafortsätze miteinander verbunden sind (epidermal-dermale Junktionszone).

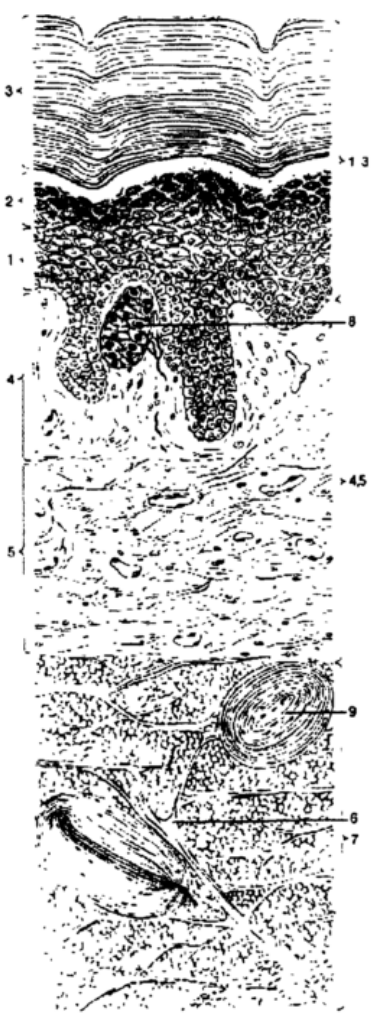


Abb. 3: Aufbau der Haut, histologische Übersicht (19)

1 – 5 Cutis = Epidermis und Dermis
1 – 3 Epidermis
1 Regenerationsschicht
2 Hornbildungsschicht
3 Hornschicht
4, 5 Dermis
4 Papillarschicht
5 Geflechtschicht
6 Retinacula cutis
7 Tela subcutanea
8 Meissnersches Tastkörperchen
9 Vater-Pacinisches Lamellenkörperchen

2.2 Die dendritischen Zellen der Haut:

Die kutanen dendritischen Zellen werden in zwei Zelltypen unterteilt:
Die **dermalen dendritischen Zellen** sind *in situ* nicht eindeutig definiert. In der Zellkultur nach Auswanderung aus dem Gewebe besitzen sie den gleichen Phänotyp wie reife dendritische Zellen, zum Beispiel hohe MHC-Klasse II-Expression, Fehlen der Monozyten/Makrophagen-, Lymphozyten- und Endothelzell-Marker, Expression von Adhäsions- und costimulatorischen Molekülen (CD11/CD18, CD54, CD80, CD86, CD40) und starke T-Zell-Stimulationsfähigkeit (20).
Die **Langerhanszellen** der Epidermis ähneln unreifen dendritischen Zellen aufgrund des Vorhandenseins von MHC-Molekülen in geringen Mengen, von Monozyten/Makrophagen-Markern, NLDC-145 (21) und der für sie typischen Birbeck-Granula, deren Funktion nach wie vor nicht geklärt ist (4,7). Langerhanszellen werden als spezialisierte unreife dendritische Zellen angesehen, die aus dem Knochenmark stammend (2) in der Epidermis Antigen aufnehmen und prozessieren können (22). Nach Antigenaufnahme und durch diverse inflammatorische Zytokine stimuliert, beginnen sie, über die afferente Lymphe in die Lymphknoten zu wandern (23), um dort effektiv T-Zellen zu stimulieren und eine primäre Immunantwort auszulösen. Dieses Modell der Langerhanszell-Reifung und -Wanderung wird durch *in vitro*-Experimente gestützt, die zeigten, daß frisch isolierte Langerhanszellen sehr gut Antigene prozessieren können. Nach Kultivierung sind die reifen Langerhanszellen in der Lage, prozessierte Proteine effektiv T-Lymphozyten zu präsentieren (24).
Eine weiterer Zelltyp, der in der Dermis vorkommt und für die Immunfunktion der Haut wichtig ist, sind die Vorläufer der kutanen dendritischen Zellen. Sie stammen aus dem Knochenmark und wandern vermutlich über die Dermis in die Epidermis ein, um dort durch Emigration der Langerhanszellen entstandene Lücken wieder aufzufüllen.

2.3 Zytokinproduktion in der Haut:

Zytokine sind Immunbotenstoffe, die von verschiedensten Zellen gebildet werden. Sie vermitteln und regulieren in einem sehr komplexen Wechselspiel die Immunantwort sowohl im Rahmen der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr. Sie werden als Reaktion auf Kontakt mit bakteriellen

(Lipopolysaccharide) und viralen Bestandteilen, Kontaktallergenen oder Parasiten von Immunzellen *de novo* gebildet und rasch sezerniert. In einer Kaskade können sie die Produktion anderer Zytokine beeinflussen und mit diesen synergistisch oder antagonistisch wirken. Die Wirkung beruht auf einer Bindung an spezifische Rezeptoren, wobei sie autokrin auf die gleiche Zelle, parakrin auf die Nachbarzellen und endokrin auf entfernt liegende Zellen wirken können. Durch die Zytokin-Rezeptor-Bindung werden in der Zielzelle verschiedenste Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren in Gang gesetzt, die zu einer verstärkten Proliferation, Zytokin- oder Antikörperfreisetzung führen.
Die Epidermis ist hinsichtlich ihres Zytokinmusters besser untersucht als die Dermis, da sie weniger verschiedene Zelltypen enthält. Keratinozyten und Langerhanszellen sind die Hauptquellen für Zytokine, wobei aber auch Melanozyten und epidermale dendritische T-Zellen Zytokine sezernieren können. Die Dermis enthält viel mehr Immunzellen (dermale dendritische Zellen, Lymphozyten, Makrophagen etc.), die Zytokine freisetzen können, die unter anderem in die Epidermis diffundieren können. Daher wird in dieser Arbeit hauptsächlich auf die Zytokininduktion und -produktion in der Epidermis eingegangen.

2.3.1 Zytokinproduktion der Keratinozyten:

Zur Untersuchung des Zytokinvorkommens *in situ* werden Keratinozyten isoliert und ihre mRNA-Expression gemessen. Durch Vergleich mit dem mRNA-Muster nach Kultivierung der Zellen konnte festgestellt werden, daß Zytokine im Laufe der Kultur vermehrt freigesetzt werden (25). Es konnten die mRNA´s für IL-1α und IL-1β nachgewiesen werden, wobei nur IL-1α in biologisch aktiver Form von Keratinozyten sezerniert werden kann (26). Weiters konnte die Produktion von GM-CSF, M-CSF (27), TNFα (28, 29) und diverser anderer Interleukine, wie zum Beispiel IL-6 (30), IL-10 (31) gemessen werden. In Tab. 3 ist die mRNA-Expression der Keratinozyten im Vergleich zu Langerhanszellen dargestellt.

2.3.2 Zytokinproduktion in Langerhanszellen:

Auch hier unterscheidet sich das Zytokinmuster der frisch isolierten und der kultivierten Zellen. Im wesentlichen waren mRNA´s für IL-1β, IL-6, MIP-1α und MIP-2

nachweisbar, wobei die IL-1β-Produktion in der Kultur erhöht wurde (25, 28, 32). Nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Phorbol Myristat Azetat (PMA) konnte auch in Langerhanszellen eine TNFα-Produktion festgestellt werden (33) (Tab. 3).

Tab. 3: Zytokin-mRNA-Expression von Langerhanszellen und Keratinozyten *in situ* oder in Kultur

Zytokine	frisch isolierte Langerhanszellen	kultivierte Langerhanszellen	frisch isolierte Keratinozyten	kultivierte Keratinozyten
IL-1α	-	-	+	++
IL-1β	+	++	+[1]	+[1]
GM-CSF	-	-	+	++
TNFα	-[2]	-[2]	+	++
IL-6	-	+	+	+
IL-10	-	-	+	+
MIP-1α	++	+	-	-
MIP-2	++	+	+	+

Legende: Langerhanszellen und Keratinozyten über 72 h kultiviert;

-... nicht nachgewiesen

+ ... nachgewiesen

++ ... Zunahme

[1] ... nicht in biologisch aktiver Form nachgewiesen

[2] ... nur nach Stimulierung mit LPS oder PMA nachgewiesen

2.4 Beeinflussung der Wanderung kutaner dendritischer Zellen durch in der Haut gebildete Zytokine:

Die Zytokine, die in der Epidermis und Dermis gebildet werden, beeinflussen die Emigration der kutanen dendritischen Zellen aus der Haut in die Lymphknoten. In komplexen synergistischen und/oder antagonistischen Wechselwirkungen kann die Wanderung und die Reifung der Zellen induziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der oben genannten Zytokine auf ihren Einfluß auf die Wanderung kutaner dendritischer Zellen mit Hilfe der Organkultur untersucht.

TNFα, das vor allem von sensibilisierten Keratinozyten, aber auch unter bestimmten Bedingungen von Langerhanszellen gebildet wird, gilt als einer der wichtigsten Induktoren zur Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (34). Zusätzlich kann TNFα die Zellviabilität steigern bzw. erhalten (35).

In engem Zusammenspiel mit diesem inflammatorischen Zytokin wird **IL-1β**, das von Langerhanszellen gebildet wird, als zusätzlicher Induktor betrachtet (36). Inwieweit diese zwei Zytokine in einer Kaskade wirken, ist Gegenstand der laufenden Forschungsarbeit. Das eng verwandte **IL-1α** wird von Keratinozyten gebildet und kann die Funktion von IL-1β ersetzen (36), wobei der genaue Wirkungsmechanimus und die biologische Funktion dieses Zytokins nicht geklärt sind. Sehr wahrscheinlich spielt es durch Erhöhung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von dendritischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion der primären Immunantwort (37).

Das von Langerhanszellen sezernierte Chemokin **MIP-1α**, das durch IL-1β und LPS induziert wird (38), spielt eine wichtige Rolle bei viralen Infektionen (39) und kann eine gerichtete Migration von dendritischen Zellen auslösen (40). Eine weitere mögliche Funktion ist die Rekrutierung von Vorläufern der Langerhanszellen in die Haut ; dies ist für MCP-1, ein ähnliches Chemokin, beschrieben worden (41).

IL-10 gilt als tolerogenes Zytokin für dendritische Zellen, da es einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung und Reifung von Langerhanszellen und dendritischen Zellen aufweist (42). Es kann in mononukleären Zellen die Expression von TNFα, IL-1β und MIP-1α inhibieren (43, 44). Als Antagonist zu TNFα und IL-1 spielt es bei der Induktion einer Immunantwort in der Haut eine wichtige Rolle, da es deren Entstehung inhibieren kann.

GM-CSF kann in Kulturen mit Blut- oder Knochenmark-Vorläufern eine Reifung der dendritischen Zellen induzieren und die Zellviabilität erhöhen (45, 46), aber der genaue Einfluß auf die Migration kutaner dendritischer Zellen ist noch nicht bekannt.

3 Zielsetzung der Diplomarbeit:

Die Methode der Wahl in dieser Arbeit war die Kultivierung von muriner Haut nach dem Modell von Larsen et al. (9). Die Organkultur war weiter modifiziert worden und erwies sich als geeignet für die Untersuchung der Emigration von kutanen dendritischen Zellen und deren Induktoren (47, 48, 49). Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Zytokinen und Antikörpern in das Medium, auf dem die Hautproben aufschwimmen, können dosisabhängige migrationssteigernde und inhibitorische Effekte durch Veränderungen der Zahl an emigrierenden Zellen im Medium bestimmt werden. Bei vorheriger Trennung der Epidermis und Dermis könnte das Migrationsverhalten von Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen getrennt untersucht werden, was aber aufwendiger und kostenintensiver wäre. Daher wurde die Organkultur mit kompletter muriner Haut durchgeführt und die Wanderung beider Zelltypen beobachtet. Durch ihr ähnliches Aussehen ist eine Unterscheidung der epidermalen und der dermalen Zellen im Lichtmikroskop hierbei nicht möglich.

3.1 Optimierung der Organkultur:

Zu Beginn wurden Versuche zur Optimierung der Organkultur durchgeführt. Der hohe Verbrauch an Zytokinen und Antikörpern und die teilweise unvollständige Wirkung der Reagenzien sollten vermieden werden.

Fragestellungen:

1. Kann durch Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation bei +4°C eine bessere und gezieltere Wirkung der Zytokine und Antikörper erreicht werden?
2. Führt die Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium zur verbesserten Diffusion der Zytokine und Antikörper zwischen den verhornten Keratinozyten in die Epidermis?

3.2 Einfluß der inflammatorischen Zytokine TNFα und IL-1β auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen:

Die zwei in der Epidermis gebildeten Zytokine können die Zahl der Langerhanszellen in der Haut verringern. In den Lymphknoten waren Anhäufungen von dendritischen Zellen zu beobachten, was auf eine gerichtete Wanderung in lymphatisches Gewebe hindeutet (34, 36, 50). Auf der Grundlage der Vorarbeiten von Ortner und Zanella (47, 48) war eine gezielte Untersuchung der Wirkung von TNFα und IL-1β auf die Migration möglich.

Fragestellungen:

1. Ist die TNFα-Wirkung dosisabhängig?
2. Wirken hohe Dosen von TNFα toxisch auf die kutanen dendritischen Zellen?
3. Können Antikörper gegen TNFα die migrationsfördernde Wirkung aufheben und die Wanderung im reinen Kulturmedium beeinflussen, d.h. wirkt in den Kulturen endogener TNFα?
4. Kann IL-1β in hoher Dosis die Migration steigern?
5. Können die Antikörper gegen IL-1β die Wirkung von TNFα und die Wanderung im reinen Medium verändern, d.h. wirkt in den Kulturen endogenes IL-1β?
6. Gibt es eine Kaskade zwischen TNFα und IL-1β, d.h. induziert ein Zytokin das andere?
7. Können mit Hilfe von Elisa die Konzentrationen an endogenem TNFα und IL-1β bestimmt werden?

3.3 Lipopolysaccharide als Induktoren der Wanderung:

Die im Rahmen der Immunabwehr von gram-negativen Bakterien aus der Zellwand freigesetzten Lipopolysaccharide (LPS) wirken als Endotoxine. Sie führen durch Induktion von Zytokinen, in der Epidermis hauptsächlich von TNFα und IL-1α, zu einer Stimulation der Emigration von Langerhanszellen (50).

Fragestellungen:

1. Führt eine Zugabe von LPS ins Medium zu einer Steigerung der Migrationsrate?
2. Ist die LPS-Wirkung dosisabhängig?
3. Wird die LPS-Wirkung von TNFα vermittelt?
4. Können durch LPS induzierte Zytokine, wie z.B. TNFα, mit Elisa nachgewiesen werden?

3.4 Die Rolle von MIP-1α bei der Migration:

In der Epidermis werden neben inflammatorischen Zytokinen auch Chemokine, die auf Zellen chemotaktisch wirken und ihre Wanderung induzieren können, von Langerhanszellen produziert. Die durch die Auswanderung von Langerhanszellen entstandenen Lücken in der Epidermis müssen durch nachkommende Vorläufer aus dem Knochenmark wieder aufgefüllt werden. Bei einer Migrationsauslösung durch Antigenkontakt können die Langerhanszellen zusätzlich zu den inflammatorischen Zytokinen Chemokine freisetzen, die eine Rekrutierung von Vorläuferzellen in die Haut bewirken (41). Weiters kann MIP-1α die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNFα induzieren (51).

Fragestellungen:

1. Kann MIP-1α die Migration steigern?
2. Ist die Wirkung dosisabhängig?
3. Führt eine Zugabe von anti-TNFα und anti-IL-1β zu einer Beeinflussung der MIP-1α-Wirkung?

3.5 IL-10 und IL-4 als inhibitorische Zytokine für kutane dendritische Zellen:

IL-10 und IL-4 haben eine inhibitorische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, Langerhanszellen und dendritische Zellen. Beide Zytokine können die Synthese von zahlreichen anderen Zytokinen verhindern (52). Der inhibitorische Effekt von IL-4 ist nicht ganz so offensichtlich und gut untersucht wie bei IL-10. Im Gegenteil, IL-4 wird mittlerweile zusammen mit GM-CSF dazu verwendet, Monozyten aus peripherem humanen Blut in Kultur zur Entwicklung in dendritische Zellen zu stimulieren (45).

Fragestellungen:

1. Führt eine Zugabe von anti-IL-10 in die Organkultur durch Abblocken des endogenen IL-10 zu einer Steigerung der Migrationsrate?
2. Hat IL-4 Einfluß auf die Wanderung durch Stimulation von Monozyten-Vorläufern in der Dermis zur Entwicklung in Langerhanszellen?

3.6 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur:

Das von Keratinozyten produzierte GM-CSF kann die Reifung und Zellviabilität von Langerhanszellen fördern (37). Den gleichen Effekt hat es in Kulturen mit Blut-Monozyten zur Generierung von dendritischen Zellen (45) und in Kulturen von murinen Knochenmarksvorläufern dendritischer Zellen (53). Ein möglicher Einfluß auf die Wanderung dieser Zellen ist noch nicht genau untersucht, aber es scheint durch Hochregulierung des GM-CSF-Rezeptors durch TNFα und IL-1 zu einer gesteigerten Reifung der Zellen und somit zu einer Induktion der Emigration zu kommen.

Fragestellungen:

1. Kann GM-CSF die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur beeinflussen?
2. Ist endogenes GM-CSF in den Kulturüberständen mit Elisa meßbar?

3.7 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen und der Haut nach der Organkultur:

Ergänzend zu den Studien über die Emigration der kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur wurden die Hautproben vor und nach der Kultur mit Immun-fluoreszenz-Färbungen und Rasterelektroenenmikroskopie untersucht.

3.7.1 Immunfluoreszenz:

Fragestellungen:

1. Sind Unterschiede in der Langerhanszelldichte in der Epidermis vor und nach der Kultur zu erkennen?
2. Kann man *cords* in der Dermis sehen?
3. Sind die dendritischen Zellmarker In-1 und 2A-1 auf den Zellen *in situ* und *in vitro* nachweisbar?

3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie:

Fragestellungen:

1. Sind emigrierende Langerhanszellen an der Epidermisunterseite zu beobachten?
2. Wie sieht die Dermisunterseite aus?
3. Kann man einen Unterschied zwischen den in 24 und 48 Stunden und den aus der Epidermis und der Dermis getrennt ausgewanderten Zellen sehen?
4. Unterscheiden sich die in epidermalen Zellsuspensionen gereiften Langerhanszellen von den aus der Epidermis ausgewanderten Zellen?

B. Material und Methoden

1 Materialien, Cytokine, Antikörper, Geräte:

1.1 Materialien:

2,2´-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Ammoniumthiocyanat	Merck, Darmstadt, BRD
BALB/c-Mäuse	Charles River Germany, Sulzfeld, BRD
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomex, Mannheim, BRD
C57BL/6-Mäuse	Charles River Germany, Sulzfeld, BRD
Cacodylat-Natriumsalz	Fluka, Buchs, Schweiz
3,3´-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Polysciences INC, Warrington, PA, USA
Dispase II	Boehringer-Mannheim, Mannheim, BRD
DNase from bovine pankreas (grade II, 5 mg/ml)	Boehringer-Mannheim, Mannheim, BRD
Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, BRD
Dinatriumdihydrogenphosphat ($Na_2H_2PO_4 \times 2H_2O$)	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Fetales Kälberserum	Biological Industries, Beth Harmek, Israel
Gentamycin (20 mg/ml)	Amimed AG, Allschwil, CH
Gewebekultur-Petrischalen	Falcon, Oxnard, CA, USA
Gewebekultur-24-well-Platten	Costar, Cambridge, MA, USA
Gewebekultur-96-well-Platten	Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
200 mM L-Glutamin	Life Tech. Ltd., Paisley, Scotland
25%iges Glutaraldehyd	Gröpl, Plano, Wien, Austria
HANK´s Salzlösung	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
1 M HEPES Puffer	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, BRD
Komplement (Low Tox-M Rabbit Complement)	Sera-lab, Crawley Down, Sussex, England
0,05 mM 2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Platten, MaxiSorp F96)	Nunc Bulletin, Roskilde, Dänemark
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt, BRD
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Polysciences INC, Warrington, PA, USA

PBS (Phosphat-Buffered-Saline)	Biological Industries, Beth Hamerk, Israel
Poly-L-Lysin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Costar, Cambridge, MA, USA
Ratten-Gammaglobulin	Jackson Immuno Research Lab., PA, USA
RPMI 1640	Biological Industries, Beth Hamerk, Israel
Szintillationsflüssigkeit (Optiszint-High-Safe)	Pharmacia, Wien, Austria
H^3-Thymidin (spez. Aktivität 2447, 9 GBq/mmol = 6,7 Ci/mmol)	New England Nuclear, Boston, MA, USA
Tris-HCl	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
2,5%-iges Trypsin	Sera-lab, Crawley Down, Sussex, England
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories, Burrington, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Zitronensäure-1-hydrat	Merck, Darmstadt, BRD

1.2 Zytokine

1.2.1 Zytokine für die Organkultur:

rekombinanter muriner TNFα ($1,2\times10^7$ U/mg)	Dr. G.R. Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Austria
rekombinantes murines IL-1β ($\geq1\times10^7$ U/mg)	Genzyme, Cambridge, MA, USA
rekombinantes murines IL-1β ($>1\times10^7$ U/mg)	Biomol, Hamburg, Deutschland
rekombinantes murines IL-1β ($>5\times10^8$ U/mg)	Pharamacia, Wien, Austria
rekombinanter muriner GM-CSF ($1,9\times10^7$ U/mg)	Dr. E. Liehl, Novartis, Wien, Austria
rekombinantes murines IL-4 ($\sim1\times10^7$ U/mg)	Genzyme, Cambridge, MA, USA
rekombinantes murines MIP-1α (2×10^5 U/mg)	R&D-Systems, Abingdon, UK

1.2.2 Standards für Elisa:

rekombinanter muriner GM-CSF (10 µg/ml)	Pharmingen San Diego, CA, USA
rekombinanter muriner TNFα (50 µg/ml)	Pharmingen San Diego, CA, USA
rekombinantes murines IL-1β (5 µg/ml)	Endogen, Cambridge, MA, USA

1.3 Antikörper:

1.3.1 Antikörper für die Organkultur:

polyklonaler anti Maus-TNFα	Biosource Int., CA, USA
monoklonaler anti Maus-TNFα (V1q)	Dr. B. Echtenacher, Regensburg, BRD (54)
mono- und polyklonaler anti Maus-IL-1β	Genzyme, Cambridge, MA, USA
monoklonaler anti Maus-IL-1β	R&D-Systems, Abingdon, UK
monoklonaler anti Maus-IL-1α	R&D-Systems, Abingdon, UK
monoklonaler anti Maus-IL-10	Endogen, Woburn, MA, USA

1.3.2 Antikörper für Elisa:

Capture-Antikörper:

monoklonaler anti Maus GM-CSF	Pharmingen San Diego, CA, USA
monoklonaler anti Maus/Ratte TNFα	Pharmingen San Diego, CA, USA
polyklonaler anti Maus IL-1β	Endogen, Cambridge, MA, USA

Detektor-Antikörper:

monoklonaler anti Maus GM-CSF, biotinyliert	Pharmingen San Diego, CA, USA
monoklonaler anti Maus TNFα, biotinyliert	Pharmingen San Diego, CA, USA
polyklonaler anti Maus IL-1β, biotinyliert	Endogen, Cambridge, MA, USA

Peroxidasekonjugat:

Avidin-Peroxidase-Komplex	Sigma, St. Louis, MO, USA

1.3.3 Antikörper für die Färbungen von *sheets* und Zytozentrifugationen:

Primärantikörper:

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Name	Klon	ATCC	Ag-Spezifität	Ig-Klasse	Quelle
B21.2	B21.2	TIB 229	MHC Klasse II $I\text{-}A^{b,d}$	Ratte IgG2b	R. M. Steinman[1]
2G9-FITC	2G9	-	$I\text{-}A^{d}$, $I\text{-}E^{d}$	Ratte IgG2a	Pharmingen[2]
-	-	TIB 120	$I\text{-}A^{b,d,q}$ $I\text{-}E^{d,k}$	Ratte IgG2b	ATCC[3]
In-1	In-1	-	Invariante Kette	Ratte IgG2b	N. Koch[4] (55)
2A1	2A1	-	Intrazelluläre Organellen in reifen DC und B-Zellen	Ratte IgG2a	R. M. Steinman[1] (53)
MAC-1	-	-	Chlamydien-Zellwand-Protein	Ratte IgG2a	EACC[5]
LO-DNP11	-	-	DNP-Gruppe	Ratte IgG2b	Univ. Brüssel[6]
RB6-8C5	-	-	Granulozyten	Ratte IgG2b	R.M. Steinman[1]

[1] The Rockefeller University, New York, USA

[2] San Diego, CA, USA

[3] American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

[4] Universität Bonn, BRD

[5] European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK

[6] Université de Louvain, Bruxelles, B

Sekundärantikörper:

Schaf anti-Ratte Ig, biotinyliert, Spezies-spezifisch	Amersham Life Science, Amersham, UK
Schaf anti-Maus Ig, biotinyliert, Spezies-spezifisch	Amersham Life Science, Amersham, UK

Fluoreszenzkonjugate:

Streptavidin-FITC	Amersham Life Science, Amersham, UK
Streptavidin-Texas Red	Amersham Life Science, Amersham, UK

Peroxidasekonjugat:

Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex	Amersham Life Science, Amersham, UK

1.4 Geräte:

sterile Werkbank (Danlaf 1206)	Uniequip, Martinsried, BRD
CO_2-Auto-Zero (Brutschrank)	Heraeus Instruments, Uniequip, Martinsried, BRD
Cytospin 2 (Zytozentrifuge)	Shandon, Firma Sanitas, Wien, Austria
Flüssigszintillationszähler	Wallac 1410, Pharmacia, Wien, Austria
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60	Olympus Optical Co, Ltd., Japan
Hämatocytometer	Double Neubauer, 0,1 mm, Reichert Bright-line, New Jersey, USA
MS 1 Minishaker	IKA, Firma Gatt, Wien, Austria
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech, Firma Gatt, Wien, Austria
PHD-Cell-Harvester	Cambridge Technology INC., MA, USA
Rasterelektronenmikroskop	DSM 982 Gemini Zeiss, Oberkochen, BRD
Spectrareader (Photometer)	SLT-Labinstruments, Grödig, Austria
Durchlichtmikroskop	Reichert, Fa. Leitz, Wien, Austria

2 Lösungen:

2.1 Medium für die Organkultur:

Kulturmedium (R10-Medium)

RPMI 1640	500 ml
Fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert (56°C, 30 min.)	55 ml
L-Glutamin (Endkonzentration 200 µM)	5 ml
2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 0,05 µM)	0,5 ml
Gentamycin (Endkonzentration 20 µg/ml)	0,5 ml

R10-Hepes-Medium

RPMI 1640	500 ml
HEPES	3,5 ml

2.2 Lösungen für die Kultur epidermaler Zellsuspensionen:

Trypsinisierung

Dorsale Ohrhälfte (Trypsin Endkonzentration 0,42%):

2,5%-iges Trypsin	1,5 ml
HANK´s	9 ml

Ventrale Ohrhälfte (Trypsin Endkonzentration 1,89%):

2,5%-iges Trypsin	4,5 ml
HANK´s	6 ml

Cytotoxmedium

RPMI 1640	481,9 ml
HEPES	2,5 ml
dBSA (35%-ige Stammlösung)	5,6 ml

pH-Wert auf 7,3 einstellen

Komplementlösung

Low Tox Komplementlösung	1 Aliquot
A. dest.	1 ml

1 Aliquot in 1 ml A. dest. lösen

DNase (Endkonzentration)	0,5 ml
Cytotoxmedium	8,5 ml

Sterilfiltrieren

Das Komplement liegt in einer Endverdünnung von 1:10 vor.

2.3 Lösungen zur Herstellung von epidermalen *sheets*:

0,1 M Phosphatpuffer

$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	8,9 g
KH_2PO_4	6,8 g
A. dest.	500 ml

pH-Wert auf 6,8 mit 1N HCl einstellen

0,5 M Ammoniumthiocyanat

NH_4SCN	7,6 g
0,1 M Phosphatpuffer	200 ml

PBS/BSA-Lösung

Bovines Serum Albumin (BSA, 35%-ige Stammlösung)	3,5 ml
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	100 ml

2.4 Lösungen für die Färbung epidermaler und dermaler *sheets* und der Zytozentrifugationen:

PBS/BSA-Lösung

wie unter 2.3

0,05 M Tris-HCl-Puffer

basischer Tris-Puffer	56 ml
saurer Tris-Puffer	194 ml

0,5 M Puffer auf pH 7,6 einstellen und anschließend 1:10 verdünnen

Diaminobenzidinlösung

Diaminobenzidintetrahydrochlorid	10 mg
Tris-HCl-Puffer	20 ml

kurz vor Reaktion:

30%-iges Perhydrol (Endkonzentration 7,5%)	5 µl

2.5 Lösungen für Elisa:

2.5.1 Lösungen für GM-CSF- und TNFα-Elisa:

Beschichtungspuffer

Na_2CO_3	320 mg

$NaHCO_3$	590 mg
A. dest.	200 ml

pH-Wert auf 9,6 einstellen

Assaypuffer (Phosphatpuffer, PBS)

NaCl	80 g
Na_2HPO_4	11,6 g
KH_2PO_4	2 g
KCl	2 g
A. dest.	10 l

pH-Wert auf 7,4 einstellen

PBS / 10% FCS

Fetales Kälberserum (FCS)	10 ml
Phosphatpuffer (PBS)	90 ml

Waschpuffer

Phosphatpuffer wie unter 2.5.1;

Phosphatpuffer mit Tween 20

Tween 20	500 µl
Phosphatpuffer	1 l

Substratlösung

Zitronensäure-1-hydrat	1,76 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	2,24 g
ABTS	0,19 g

pH-Wert auf 4,3 - 4,6 einstellen

2.5.2 Lösungen für den IL-1β-Elisa:

Beschichtungspuffer

Phosphatpuffer mit pH 7,4 wie unter 2.5.1

Assaypuffer (Phosphatpuffer mit 3% BSA, PBS /3% BSA)

NaCl	2,92 g
Na_2HPO_4	0,36 g
BSA	3 g
Tween 20	50 µl
A. dest.	100 ml

pH-Wert auf 7,2 - 7,4 einstellen

Waschpuffer

Phosphatpuffer wie unter 2.5.1;

Phosphatpuffer mit Tween 20 wie unter 2.5.1

Substratlösung

wie unter 2.5.1

2.6 Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie:

0,1 M Cacodylatpuffer

Cacodylat	21,4 g
A.dest.	1000 ml

pH-Wert auf 7,4 mit 0,1 M HCl einstellen

Karnovsky´s Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Fixativ (FG)

Paraformaldehyd	2 g
A. bidest.	25 ml

auf 60-70°C erhitzen, rühren

1N NaOH	2-4 Tropfen (bis Lösung klar wird)

abkühlen unter fließendem Wasser

25%-iges Glutaraldehyd	10 ml
0,2 M Na-Cacodylatpuffer	25 ml
$CaCl_2$	25 mg

mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer auf 100 ml auffüllen

pH 7,4 überprüfen

1,5%-iges Osmiumtetroxid

1,5%-ige Lösung in A. dest. herstellen

Alkoholreihe

50%-iger Ethanol

75%-iger Ethanol

95%-iger Ethanol

100%-iger Ethanol

3 Methoden:

3.1 Organkultur:

Im Modell nach Larsen (9) wurde Ohrhaut von Mäusen verwendet, um die Wanderung von Langerhanszellen zu beobachten.
Die Mäuse wurden *lege artis* mit CO_2 getötet oder mit Äther betäubt und die Ohren an der Basis abgeschnitten. Nach einer Abliegezeit von 26-28 Stunden bei +4°C wurden die Ohren in 70%-igem Ethanol desinfiziert und unter der sterilen Werkbank 20 Minuten lang getrocknet. Anschließend wurden die dorsalen Ohrhälften (die Seiten ohne Knorpel) mit Pinzetten von der ventralen Seite abgezogen und mit der dermalen Seite nach unten auf das vorbereitete Medium in 24-*well*-Platten aufgelegt (eine Ohrhälfte pro *well*). Bei einem experimentellen Ansatz wurden 6 Ohrhälften eingesetzt. Aufgrund der Oberflächenspannung schwammen die Ohren auf dem Medium auf. Die Organkultur wurde bei 37°C und 5% CO_2 für ca. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Ohren mit einer Pinzette entfernt und entweder zu *sheets* weiterverarbeitet oder verworfen. Das Medium von 6 *wells* mit je 1,5 ml (entspricht einer Reihe) wurde in einem beschichteten 15 ml-Polypropylen-Röhrchen gesammelt und bei 1500 rpm/ 463g und +4°C 8 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100-200 µl abgesaugt, das Pellet im restlichen Volumen resuspendiert und das Volumen mit einer Kolbenhubpipette exakt bestimmt.

3.2 Bestimmung der Zellzahl:

Die Ermittlung der Wanderungsrate der Langerhanszellen erfolgte durch Zählung der im Verlauf der Kultivierung ins Medium ausgewanderten Zellen.
Aus der oben gewonnenen Zellsuspension wurden 40 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 10 µl Trypanblau gut vermischt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Zählkammer (Hämocytometer) pipettiert und anschließend die Zellen gezählt, wobei die Gesamtzellzahl, die Zahl der dendritischen Zellen (an den *veils* gut erkennbar) und die Zahl der toten Zellen in jeweils fünf Feldern bestimmt wurde.

Berechnung der Zellzahl:

$$\frac{\text{ermittelte Zellzahl/5 Felder} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times 2500\,^{*}}{\text{Anzahl der Ohrhälften}} = \text{Zellzahl pro Ohrhälfte}$$

* spezifischer Umrechnungsfaktor des Hämocytometers

3.3 Herstellung angereicherter Populationen epidermaler Langerhanszellen:

3.3.1 Herstellung der Zellsuspension:

Um eine ausreichende Menge an epidermalen Zellen zu erhalten, wurden pro Ansatz 30-40 BALB/c-Mäuse verwendet. Die Mäuseohren wurden mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und 20 Minuten unter der sterilen Werkbank getrocknet. Nach Trennung der Ohren in dorsale und ventrale Hälften wurden sie getrennt auf Trypsinlösung aufgelegt und 30 bzw. 60 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
In der Zwischenzeit wurde eine Gewebekulturschale mit 30 ml R10-Medium und einem Stahlnetz vorbereitet. Die Epidermis, die sich nach der Inkubation auf Trypsin leicht von der Dermis ablöste, wurde auf das Stahlnetz im R10-Medium aufgelegt. Anschließend wurde das Stahlnetz im Medium drei Minuten lang auf- und abbewegt („geklopft"), ohne Luftblasen im Medium zu bilden. Dadurch gelangten die durch das Trypsin aus dem Zellverband gelösten Zellen in das Medium.
Die resultierende Zellsuspension in der Gewebekultur-Platte wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 39 µm) in ein Polypropylen-Röhrchen pipettiert und bei 1200 rpm/ 296 g 8 Minuten bei +4°C abzentrifugiert. Bei der anschließenden Zählung sollte eine Zellzahl von 100-130 Millionen epidermaler Zellen mit einer eher niedrigen Zellviabilität von 70-90% erreicht werden.

3.3.2 Depletion eines Großteils der Keratinozyten:

Mit Hilfe des Komplementsystems und eines Antiköpers, der neben T-Zellen auch an Keratinozyten binden kann, kann der Hauptteil der Keratinozyten in der epidermalen Zellsuspension lysiert werden.
Die Inkubation mit 3 ml des Antikörpers Thy-1 (TIB 99) und 10 ml sterilfiltrierter

Komplementlösung erfolgte bei 37°C auf einem Schüttler im Wasserbad. Dieser Vorgang wurde mit PBS gestoppt und die Zellen anschließend abzentrifugiert (1200 rpm/ 296 g, 8 min., +4°C). Um Reste des Komplementsystems zu beseitigen, wurden die Zellen ein zweites Mal in PBS resuspendiert und wiederum wie oben abzentrifugiert.

3.3.3 „Trypsin-Trick“:

Dieser Schritt dient der Entfernung der durch das Komplement abgetöteten Zellen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml DNase (Endkonzentration), 0,5 ml Trypsin (Endkonzentration) und 9 ml PBS gelöst und wiederum bei 37°C für 10 Minuten geschüttelt. Nach Abstoppen der Reaktion mit R10 erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm/ 206 g für 8 Minuten bei 4°C.
Bei der folgenden Zählung der Zellsuspension sollte eine Zellzahl zwischen 20-30 Millionen mit einer Anreicherung von mindestens 10% Langerhanszellen und einer hohen Zellviabilität von 80-90% erreicht werden (7, 56).

3.3.4 Kultur der epidermalen Zellsuspension:

Die Kultivierung der epidermalen Zellen erfolgte entweder ohne Depletion der Keratinozyten, die das notwendige GM-CSF für die Reifung der Langerhans-Zellen produzieren, oder mit Depletion und GM-CSF-Zusatz (200 U/ml). Je 10 Millionen Zellen wurden in 10-12 ml R10-Medium pro Gewebekultur-Platte (10 cm Durchmesser) über 72 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.4 Herstellung epidermaler und dermaler *sheets*:

Für *in situ*-Färbungen kann die Haut in Epidermis und Dermis getrennt und in kleine *sheets* (Häutchenpräparate) geschnitten werden. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die beiden Hautschichten voneinander zu trennen. Für Färbungen wird allgemein die Ammonumthiocyanat-Methode von Juhlin und Shelley (57) verwendet.
Die dorsalen Ohrhälften aus der Organkultur oder von frisch abgeschnittenen Mäuseohren wurden für 20 Minuten bei 37°C auf eine 0,5 M Ammoniumthiocyanat-Lösung aufgelegt. Die Ohrhälften sollten aufschwimmen. Nach dieser Inkubation wurden sie auf einem Tropfen PBS ausgebreitet und die Epidermis von der Dermis

abgezogen. Mit einem Skalpell wurden *sheets* von einer Größe von 3×3 mm geschnitten. Nach einer 20-minütigen Fixierung in Aceton wurden die Hautstückchen zweimal in PBS und zweimal in PBS/BSA gewaschen und anschließend bei –20°C eingefroren oder gleich gefärbt.

3.5 Färbungen epidermaler *sheets*:

Die Färbung der *sheets* wurde in einem *„Sheetshifter"* (nach Dr. P. Stöger, Innsbruck) in einer 96-*well*-Platte durchgeführt. Mit dieser Vorrichtung lassen sich mehrere *sheets* gleichzeitig von *well* zu *well* transferieren.

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung:

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei +4°C. Anschließend wurden die *sheets* dreimal je 20 Minuten in PBS/BSA gewaschen. Die folgenden Färbeschritte wurden mit einem Sekundärantikörper (anti Ratte biotinyliert oder anti Maus biotinyliert, 1:100 verdünnt in PBS/BSA), gefolgt von Streptavidin-FITC (1:100) im Falle einer Einfachfärbung oder Streptavidin-Texas-Red (1:200) bei einer Doppelfärbung bei 37°C für 90 Minuten durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die *sheets* jeweils 3×20 Minuten in PBS/BSA gewaschen.
Bei einer Doppelfärbung wurden die *sheets* zur Absättigung der freien Bindungsstellen des anti Ratte-Ak mit Ratten-Gammaglobulin (100 µg/ml) inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte ohne einen weiteren Waschschritt mit einem FITC-gekoppelten Antikörper, meist ein anti-Klasse II-Ak (2G9-FITC, 1:50, (58)).
Anschließend an den letzten Waschschritt wurden die *sheets* in *Vectashield Mounting Medium for Fluorescence* eingebettet. Dieses Medium enthält Zusätze, welche das Ausbleichen der Fluoreszenz verzögern.

3.5.2 Peroxidase-Färbung:

Diese Einfachfärbung erfolgte nach dem gleichen Schema wie unter 7.1 beschrieben, jedoch wurde zur Visualisierung ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:100 verdünnt) verwendet. Die Peroxidase reagiert mit ihrem Substrat (Diaminobenzidinlösung mit 7,5% Waserstoffperoxid) und es kommt während einer Inkubation von

10 Minuten bei Raumtemperatur zu einer Braunfärbung des Präparats. Nach einem letzten Waschschritt von 3×20 Minuten in einem 0,05 M Tris/HCl-Puffer wurden die *sheets* in einem PBS/Glycerin-Gemisch (1:9) eingebettet.

3.6 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten:

Um Zellsuspensionen färben zu können, wird die Technik der Zytozentrifugation angewandt. Dabei werden Zellen in einer speziellen Zentrifuge (Cytospin 2) auf Objektträger zentrifugiert und können anschließend gefärbt werden.
In meinen Experimenten wurden 2-3×10^4 Zellen in einem Volumen von 200 µl Medium resuspendiert und in die vorgesehenen Zytozentrifugentrichter pipettiert. Bei 450 rpm wurden die Zellen 6 Minuten lang auf einen Objektträger zentrifugiert. Diese sogenannten „Zytos" wurden anschließend mindestens 30 Minuten lang an der Luft getrocknet und dann entweder bei –20°C eingefroren oder gleich für die Färbung verwendet.

3.7 Färbungen von Zytozentrifugationen:

Vor der Verwendung wurden die Objektträger mit den Zellen (eingefrorene „Zytos" mußten mindestens eine Stunde lang getrocknet werden) 5 Minuten lang in Aceton fixiert und anschließend 10 Minuten getrocknet. Die Zellen wurden mit einem Fettstift umrandet, um ein Abfließen der Antikörper- und Waschlösungen zu verhindern.
Die Färbeschritte erfolgten in der gleichen Reihenfolge wie bei der Färbung der *sheets* (B 7.1 und B 7.2), aber die Inkubationszeiten betrugen nur 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen durch Auftropfen von PBS/BSA-Lösung mit einer Pasteurpipette und gleichzeitigem Absaugen der Waschlösung auf der anderen Seite 6-10 mal gewaschen. Das Eindecken der Präparate wurde je nach Färbemethode wie oben durchgeführt.

3.8 Funktionelle Tests:

Die oxidative Mitogenese (OXMI) ist eine Methode, um die Fähigkeit von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zur Stimulation von ruhenden T-Zellen zu messen. Dabei werden syngene T-Zellen, die durch Perjodierung eine veränderte Oberfläche besitzen, von APZ zur Proliferation stimuliert (59).
Die APZ wurden in eine 96-*well*-Platte pipettiert, beginnend mit einer *top dose* von 10.000 bzw. 3.000 pro *well* in Triplikaten in einer Verdünnungsreihe (1:3 Schritten) zu je 100 µl/*well*. Als nächstes wurden 300.000 perjodierte T-Zellen, die aus der Milz und den mesenterialen Lymphknoten isoliert wurden, in 100 µl Medium in jedes *well* zu den APZ gegeben. Die Inkubation der OXMI erfolgte bei 37°C über 24 Stunden. Anschließend wurden je 50 µl H^3-Thymidin (4 µCi=148 KBq/ml) in die einzelnen *wells* pipettiert und die Platte für weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Bis zur Messung der im Laufe der T-Zell-Proliferation eingebauten radioaktiven Nukleotide wurde die Platte im Kühlschrank aufbewahrt.
Für die Radioaktivitäts-Messung mußten die Zellen zuerst mit einem Zell-Erntegerät auf Filterpapier aufgebracht werden. Nach der Trocknung der Filterplättchen wurden sie in einer Szintillationsflüssigkeit aufgelöst. Die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers gemessen. Die ermittelten Werte wurden in *counts per minute (cpm)* als Mittelwert der Triplikate angegeben.

3.9 Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay):

Diese Methode dient dem Nachweis von Proteinen in diversen Lösungen. Im Speziellen wurden hiermit Zytokine in den Kulturüberständen der Organkultur nachgewiesen.

3.9.1 Sandwich-Elisa für TNFα und GM-CSF:

Beschichtung der Miktrotiterplatten:
Pro *well* wurden 100 µl Ratte anti Maus-Zytokine (anti-TNFα: 2 µg/ml, anti-GM-CSF: 4 µg/ml) pipettiert, und die Platte wurde über Nacht bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden die *wells* einmal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Blockschritt:

Um unspezifische Bindungen mit dem Plastik zu verhindern, wurden vor Durchführung des Elisas je 200 µl PBS/10%FCS in die *wells* pipettiert, und die Platte weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die *wells* wurden wiederum mit PBS-Tween und PBS gespült.

Standard- und Probenzugabe:

Die Proben wurden in R10-Medium, die Standards in PBS/10%FCS entsprechend verdünnt und zu je 100 µl pro *well* pipettiert. Die Inkubation erfolgte wieder über Nacht bei +4°C. Die Platte wurde dreimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Detektion:

Zur Detektion des zu quantifizierenden Zytokins wurden biotinylierte Antikörper gegen TNFα und GM-CSF in einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS/10%FCS zu 100 µl/*well* auf die Elisa-Platte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die *wells* viermal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gespült.

Visualisierung:

Zur Sichtbarmachung der Menge an gebundenem Zytokin wurden je 100 µl eines Avidin-Peroxidase-Konjugats in einer Konzentration von 2,5 µg/ml in PBS/10%FCS in die *wells* gegeben. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der folgende Waschschritt wurde siebenmal mit PBS-Tween und einmal mit PBS durchgeführt. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl der Substratlösung (ABTS mit 0,03% H_2O_2) im Dunkeln. Die Stärke der Färbung ist ein direktes Maß für die Menge an gebundenem Zytokin und wurde mit Hilfe eines Photometers 30, 60 und 80 Minuten nach der Substratzugabe bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die Messungen nach 60 Minuten herangezogen, da nach dieser Zeit die Standardkurven optimal waren.

3.9.2 Sandwich-Elisa für IL-1β:

Beschichtung der Mikrotiterplatten:

Die Inkubation mit dem *Capture*-Antikörper erfolgte wie unter 11.1.1, aber mit einer Antikörper-Konzentration von 4 µg/ml in PBS/3%BSA. Die *wells* wurden anschließend nicht gespült, sondern auf einem absorbierenden Material ausgeklopft.

Blockschritt:

Das Abblocken der unspezifischen Bindungen erfolgte mit PBS/3%BSA eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Die Platte wurde zweimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Detektion:

Der biotinylierte Antikörper gegen IL-1β wurde auf 2 µg/ml mit PBS/3%BSA verdünnt und zu je 50 µl in die *wells* pipettiert.

Standard- und Probenzugabe:

Die in PBS/3%BSA verdünnten Standards und die in R10-Medium verdünnten Proben wurden zu je 50 µl in die *wells* dazugegeben. Die Inkubation der Elisa-Platte erfolgte bei Raumtemperatur über zwei Stunden. Der Waschschritt wurde zweimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS durchgeführt.

Visualisierung:

Der Avidin-Peroxidase-Komplex wurde auf eine Konzentration von 2,5 µg/ml mit PBS/3%BSA verdünnt, zu je 100 µl in die *wells* pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der Platte (zweimal in PBS-Tween und einmal in PBS) wurden je 100 µl der Substratlösung (gleich wie unter 13.1.4) in die *wells* gegeben. Die Farbentwicklung erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Messung der Zytokinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm 30, 60 und 80 Minuten nach der Substratzugabe durchgeführt, wobei ebenfalls die Ergebnisse der Messungen nach 60 Minuten für die Auswertungen verwendet wurden.

3.10 Rasterelektronenmikroskopie (REM):

3.10.1 REM von epidermalen *sheets* und kompletter muriner Ohrhaut:

Die Dispase-Methode nach Kitano et al. (60) ermöglicht eine Trennung der Epidermis von der Dermis oberhalb der Basallamina ohne Zerstörung des Zellverbandes. Dabei wurden dorsale Ohrhälften 30 Minuten bei 37°C auf einer Dispaselösung mit 1,2 U/ml inkubiert. Die abgelösten Epidermisstücke wurden auf Medium aufschwimmend über 45 Stunden im Brutschank kultiviert, wobei zu bestimmten Zeitpunkten jeweils Proben entnommen wurden. Zusammen mit nach der gleichen Methode frisch präparierter Epidermis wurden die verschieden lang inkubierten Epidermisstückchen 4 bis 5 Stunden lang im Fixans (Karnovsky`s FG) fixiert und über Nacht in Cacodylatpuffer gelagert. Die Nachfixierung erfolgte über 1 bis 1,5 Stunden in 1,5%-igem Osmiumtetroxid. Nach einem kurzen Waschschritt in Puffer wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Aus dem 100%-igen Ethanol wurden die Proben sofort kritisch Punkt getrocknet und anschließend mit Gold-Palladium besputtert.
Nach der gleichen Methode wurde Ohrhaut nach 48-stündiger Kultur fixiert und präpariert.

3.10.2 REM der Zellkulturen:

Die Zellen aus der Organkultur oder der epidermalen Zellkultur wurden aus dem R10-Medium in PBS übergeführt. Je ein Tropfen der Zellsuspensionen wurde auf Glasplättchen, die 30 Minuten bei 37°C mit Poly-L-Lysin (1:10 verdünnt mit A. dest.) inkubiert worden waren, pipettiert und 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Überschüssige Zellen und sonstige Verunreinigungen wurden mit PBS weggewaschen. Die mittels Poly-L-Lysin adhärierten Zellen wurden in warmem FG (um die Struktur der feinen zytoplasmatischen Ausläufer und Segel („*veils*“) besser zu erhalten) für 20-30 Minuten fixiert und anschließend gut in Cacodylatpuffer gewaschen. Die Nachfixierung wurde wiederum mit Osmiumtetroxyd über eine Stunde durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Proben wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und aus dem 100%-igen Ethanol heraus kritisch Punkt getrocknet und mit Gold-Palladium besputtert.

C. Ergebnisse

Die Methode der Organkultur von Haut, mit der sich die Emigration von Langerhanszellen untersuchen läßt, wurde von Larsen et al. (9) etabliert. Im Laufe der letzten Jahre wurde diese Methode im Gewebekulturlabor der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie von mehreren Diplomanden und Dissertanten weiter modifiziert (47, 48). Auf dieser Basis und mit Hilfe der ersten mit dieser Methode erhaltenen Daten, die auf einen großen Einfluß von TNFα und IL-1β auf die Wanderung der Langerhanszellen hindeuten, konnten in der vorliegenden Arbeit gezielt weitere Versuche mit diesen Zytokinen, diversen anderen Stimulantien der Migration sowie Antikörpern durchgeführt werden.

1 Optimierung der Organkultur:

Eines der großen Probleme der Organkultur war und ist das langsame und wahrscheinlich unvollständige Eindringen der Zytokine und Antikörper in das Gewebe. Das führt zu einem hohen Verbrauch an diesen Substanzen und, besonders bei Zugabe von neutralisierenden Antikörpern, zur Unsicherheit, ob diese Reagenzien in ausreichender Menge an den Wirkungsort gelangen. Deshalb wurden in früheren Experimenten die Antikörper den Mäusen vor der Tötung und dem Abschneiden der Ohren systemisch verabreicht (intradermal oder intraperitoneal). Dabei handelte es sich um Tierversuche im Sinne des Gesetzes. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen, wurden zu Beginn der Arbeit mehrere Versuche zur Optimierung der Organkultur durchgeführt.

1.1 Änderung der Bedingungen während der Vorinkubation:

1. Versuchsansatz:

Die erste Idee bestand darin, die Zytokine und Antikörper bereits während einer Vorinkubation von 26-28 Stunden im Kühlschrank, während der die endogene Zytokinproduktion eingestellt wird, auf die Ohren einwirken zu lassen. Dazu wurden die dorsalen Ohrhälften nach Desinfektion mit Ethanol auf Medium (R10-HEPES zur Stabilisierung des pH-Wertes) mit TNFα, anti-TNFα (V1q, supernatant (54)) und

anti-IL-1β in 24-*well*-Platten aufgelegt und in den Kühlschrank gestellt. Nach der Vorinkubation wurden die Platten in den Brutschrank transferiert und für weitere 48 Stunden im gleichen Medium inkubiert.

Tab. 5: Verringerte Auswanderungsrate von dendritischen Zellen (DC) nach Vorinkubation und 48-stündiger Organkultur auf R10-HEPES mit Zusätzen

Medium während der 28h Vorinkubation	Medium während der 48h Kultur	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
-	R10	28180	14100	100%
-	R10 + V1q (200 µl/welll)	35310	11550	82%
-	R10 + anti-IL-1β	20310	8900	63%
-	R10 + TNFα 50 U/ml	34260	20600	146%
-	R10 + TNFα 100 U/ml	25360	13600	97%
-	R10 + TNFα 1000 U/ml	19330	7800	55%
-	R10 + TNFα 5000 U/ml	10970	5020	36%
R10-HEPES	R10-HEPES	18530	8080	100%
R10-HEPES + V1q (500 µl/well)	R10-HEPES + V1q (500 µl/well)	15410	4750	58%
R10-HEPES + TNFα 100 U/ml*	R10-HEPES + TNFα 100 U/ml*	21820	9080	112%
R10-HEPES + V1q (500 µl/well)+ TNFα 1000 U/ml*	R10-HEPES + V1q (500 µl/well)+ TNFα 1000 U/ml*	20660	9500	117%
R10-HEPES + anti-IL-1β	R10-HEPES + anti-IL-1β	25190	9900	122%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation für 28h/+4°C: Ohren auf einem feuchten Tupfer bei den Kontrollen (R10 mit Zusätzen) bzw. auf R10-HEPES mit Antikörper- und Zytokin-Zugabe; Inkubation für 48h/ 37°C: R10–Ansätze auf frischem Medium, R10-HEPES-Ansätze auf dem gleichem Medium wie während der Vorinkubation, *...TNFα-Zugabe erst nach der Abliegezeit, anti-IL-1β: 10 µg/ml; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in den reinen Kulturmedien ohne Zusätze ist jeweils als 100% angegeben.

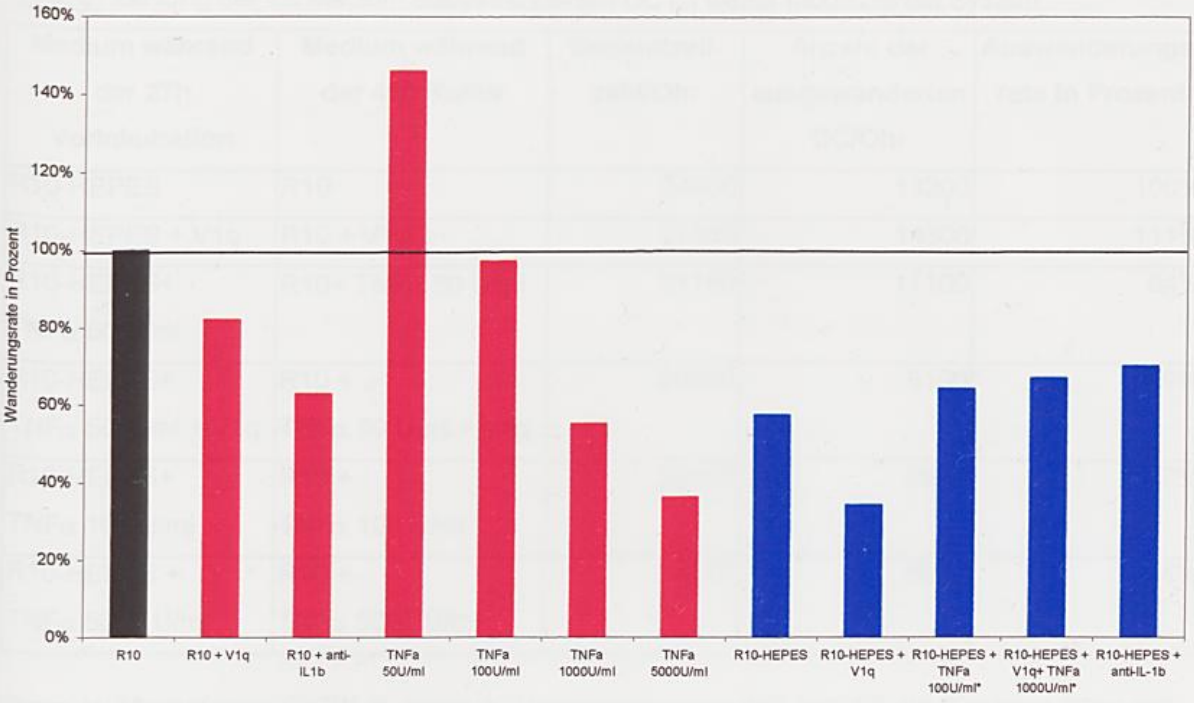


Abb. 4: Darstellung der Auswanderungsrate von kutanen dendritischen Zellen im modifizierten System, R10 ohne Zusätze und R10 mit Antikörpern und Zytokinen als Kontrollen verwendet zum Vergleich der Wirksamkeit der Vorinkubation auf R10-HEPES (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 5)

Die Zählung der dendritischen Zellen im modifizierten System (Tab. 5, Abb. 4) erwies sich als äußerst schwierig, da die Zellen kein typisch dendritisches Aussehen aufwiesen. Zusätzlich hatten sie eine eckigere Form als die Kontrollzellen aus dem R10-Medium. Daraus konnte man den Schluß ziehen, daß die Zellen im R10-HEPES keine idealen Bedingungen vorfanden und daher sowohl die Wanderung als auch die Reifung der kutanen dendritischen Zellen beeinträchtigt war. Die Zellviabilität lag bei 78-80%, war also nicht erniedrigt.

2. Versuchsansatz:

Nach diesem ersten Ergebnis wurde das System nochmals abgewandelt. Die Mäuseohren wurden nach der Vorinkubation im Kühlschrank auf R10-HEPES mit Zytokin- und Antikörper-Zusätzen nicht im gleichen Medium belassen, sondern auf ein **frisches** R10-Medium ohne HEPES mit den jeweils gleichen Zusätzen aufgelegt und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Tab. 6: Zählung der ins Medium ausgewanderten DC im weiter modifizierten System

Medium während der 27h Vorinkubation	Medium während der 48h Kultur	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
R10-HEPES	R10	24600	13200	100%
R10-HEPES + V1q	R10 + V1q	27560	14600	111%
R10-HEPES+ TNFα 50 U/ml	R10+ TNFα 50 U/ml	21180	11100	84%
R10-HEPES+ TNFα 50 U/ml + V1q	R10 + TNFα 50 U/ml + V1q	20900	9100	69%
R10-HEPES+ TNFα 100 U/ml	R10 + TNFα 100 U/ml	24400	8900	67%
R10-HEPES + TNFα 5000 U/ml	R10 + TNFα 5000 U/ml	14670	5800	44%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation auf R10-HEPES mit Zusätzen 27h/+4°C; Inkubation der Organkultur auf R10 mit Zusätzen für 48h/ 37°C, V1q: 500 µl/*well*; ein- bis zweimalige Zählung der Zellen in 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in R10-HEPES/R10 wird mit 100% als Kontrolle verwendet.

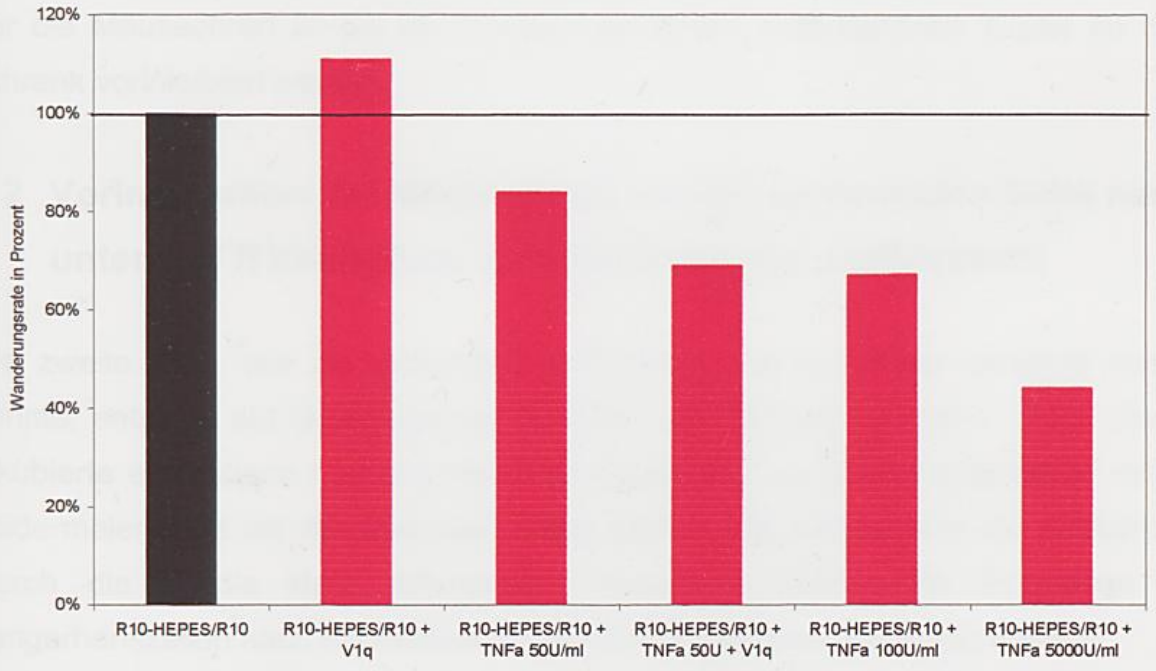


Abb. 5: Die Vorinkubation der Ohren auf R10-HEPES führte wieder zu einer Erniedrigung der Zellzahl (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 6).

Die Zellzahlen sind in diesem Versuch auf dem Niveau der Kontrolle bzw. verringert (Tab. 6 und Abb. 5). Auch bei diesem Ansatz hatte nur ein Teil der Zellen ein typisch dendritisches Aussehen und die eckige Form einiger Zellen deutete daraufhin, daß

die Vorinkubation der Mäuseohren auf R10-HEPES wieder einen negativen Einfluß auf die Wanderung und Reifung der kutanen dendritischen Zellen hatte. Die Zellviabilität war wieder im Bereich von 71-87%, was auf eine normale Absterberate der Zellen hindeutete.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß sich die Vorinkubation der Mäuseohren im Kühlschrank auf R10-HEPES zur verbesserten Wirkung der Antikörper und Zytokine als ineffektiv erwies. Bei dieser Modifikation der Organkultur kam es zu einer allgemeinen Erniedrigung der Zellzahlen, was auf einen negativen Einfluß der Bestandteile im R10-HEPES bzw. der Methode der Vorinkubation schließen läßt. Die kutanen dendritischen Zellen waren eindeutig in ihrer Wanderung und Reifung behindert, was zu einer Deformation der Zellen und dem Fehlen der typischen *veils* führte. Die Erhöhung der Zellzahl im Falle von niedrigen Dosen TNFα bzw. eine deutliche Verringerung der Zellzahl im Falle von Antikörper-Zugabe (ersichtlich aus Tab. 5, 6 und Abb. 4, 5) war nicht zu beobachten. Da die Daten zahlreicher Vorexperimente mit diesem modifizierten System nicht reproduziert werden konnten, wurde für alle weiteren Versuche die ursprüngliche Methode (siehe B 3.1) verwendet, bei der die Mäuseohren 26 bis 28 Stunden auf einem PBS-feuchten Tupfer im Kühlschrank vorinkubiert werden.

1.2 Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite nach unten auf R10-Medium mit Zytokinen und Antikörpern:

Die zweite Idee, wie die Wirkung der Zytokine und Antikörper verstärkt werden könnte, entstand auf Grundlage der Arbeiten von Rambukkana (61). Diese Gruppe inkubierte explantierte humane Haut vor Applikation von Kontaktallergenen mit der epidermalen statt mit der dermalen Seite nach unten auf Medium mit Antikörpern. Durch die in die Haut diffundierten Antikörper konnte die Emigration von Langerhanszellen nach Applikation eines Kontaktallergens verhindert werden.
Im folgenden Ansatz wurden die Ohren nach 26,5-stündiger Abliegezeit auf einem PBS-feuchten Tupfer mit der epidermalen Seite nach unten auf das Medium aufgelegt. Zusammen mit den Zytokinen und Antikörpern wurden sie eine Stunde lang im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend wurden die Ohren umgedreht, sodaß sie wie üblich mit der dermalen Seite nach unten auf dem Medium aufschwammen.

Tab. 7: Wanderungsrate der dendritischen Zellen im zweiten Optimierungsversuch

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC / Ohr	Auswanderungsrate in Prozent
keine	34300	11640	100%
TNFα 50 U/ml	28050	11270	97%
TNFα 50 U/ml + V1q (500 µl/*well*)	47000*	7500	64%
TNFα 5000 U/ml	8650	2900	25%
keine; **v**	10330	2500	100%
TNFα 50 U/ml; **v**	12250	3030	121%
TNFα 50 U/ml + V1q (500 µl/*well*); **v**	5010	1040	41%
TNFα 50 U/ml + V1q (100 µl/*well*); **v**	5600	1200	48%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 26,5h/+4°C, **v** = verkehrt aufgelegte Ohren, Vorinkubation mit epidermaler Seite nach unten: 1h/ 37°C; Inkubationzeit mit dermaler Seite nach unten: 48h/ 37°C; Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer zweimal, Zellzahlen sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate in den reinen Kulturmedien ohne Zusätze ist jeweils als 100% angegeben.

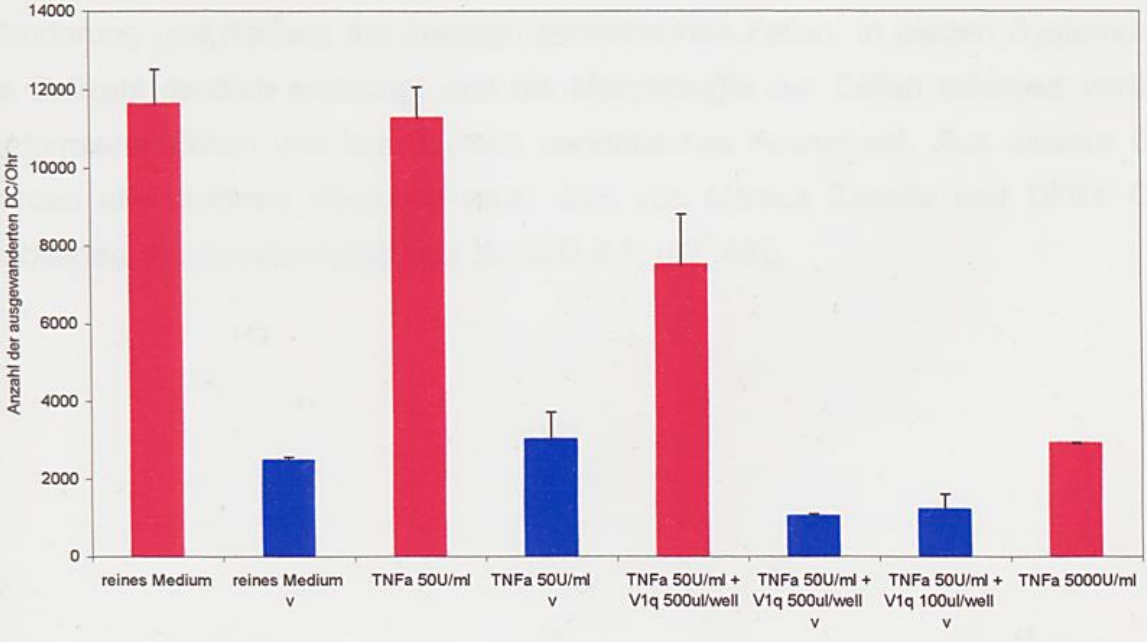


Abb. 6: Die Organkultur, bei der die Ohren mit der epidermalen Seite nach unten vorinkubiert wurden, zeigte keine verbesserte Wirkung der Zytokine und Antikörper (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 7). v...Ohren verkehrt aufgelegt

Bei der zweiten Modifikation des Organkulturmodells war eine deutliche Steigerung der Wanderungsrate durch TNFα 50 U/ml und eine Hemmung der Wanderung durch anti-TNFα und anti-IL-1β zu erkennen. Jedoch kam es im Vergleich zu den Kontrollen zu einer starken Verminderung der Zellzahl (Tab. 7 und Abb. 6). Die dendritischen Zellen zeigten in diesem Fall deutlich ausgeprägte *veils*. Eine Ursache für die verminderte Emigration der Langerhanszellen könnte sein, daß aufgrund der Vorinkubation mit der epidermalen Seite nach unten die dendritischen Zellen nicht aktiv aus den Mäuseohren auswandern konnten. Wahrscheinlich bleiben die DC durch die Änderung der Auswanderungsrichtung bzw. die umgekehrte Einwirkungsrichtung der Stimulantien im Gewebe stecken und können trotz nachfolgender Inkubation mit der dermalen Seite nach unten nicht mehr über die Lymphbahnen ins Medium auswandern. Eine weitere Erklärung wäre, daß die der Luft ausgesetzte Dermis während der einstündigen Vorinkubation ausgetrocknet ist, und die Zellen nicht mehr durch diese Hautschicht wandern konnten.

1.3 Zusammenfassung zur Optimierung der Organkultur:

Beide Versuche, die Wirkung der Antikörper und Zytokine durch erleichtertes Eindringen ins Gewebe zu verbessern, zeigten einen negativen Einfluß auf die Wanderung und Reifung der kutanen dendritischen Zellen. In beiden Systemen war die Zellzahl deutlich erniedrigt und die Morphologie der Zellen teilweise verändert (deformierte Zellen und kein typisch dendritisches Aussehen). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche nach dem von Monica Zanella und Ulrike Ortner etablierten System durchgeführt (siehe B 3.1, (47, 48)).

2 Untersuchungen zur Wanderung der Langerhanszellen:

Aus Vorversuchen von Ortner, Zanella, Koch und Janke (47, 48) war bereits bekannt, daß TNFα in niedrigen Dosen migrationsfördernd und in hohen Dosen hemmend auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen wirkt. Mit Hilfe dieser Daten konnten in dieser Diplomarbeit gezielt weitere Wirkungen von TNFα, vor allem in hoher Dosis (Untersuchung zur Toxizität), sowie Antikörper gegen TNFα und das komplexe Wechselspiel verschiedenster Zytokine und Chemokine untersucht werden.

2.1 TNFα kann in der Organkultur die Migration der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen:

2.1.1 Die TNFα-Wirkung ist dosisabhängig:

Zuerst wurden Versuche bezüglich der Wirkung von verschiedenen Dosen TNFα auf die Wanderung der Langerhanszellen durchgeführt. Dazu wurde in einer TNFα-Reihe die Anzahl der Units pro ml ständig erhöht.

Tab. 8: Die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen ist dosisabhängig.

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
keine	36350*	12150	100%
TNFα 50 U/ml	36430	13990	115%
TNFα 75 U/ml	22140	9300	77%
TNFα 100 U/ml	27250	12230	101%
TNFα 200 U/ml	24600	7700	63%
TNFα 500 U/ml	23430	6510	54%
TNFα 1000 U/ml	29220	6160	51%
TNFα 5000 U/ml	15420	5110	42%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung der DC in 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

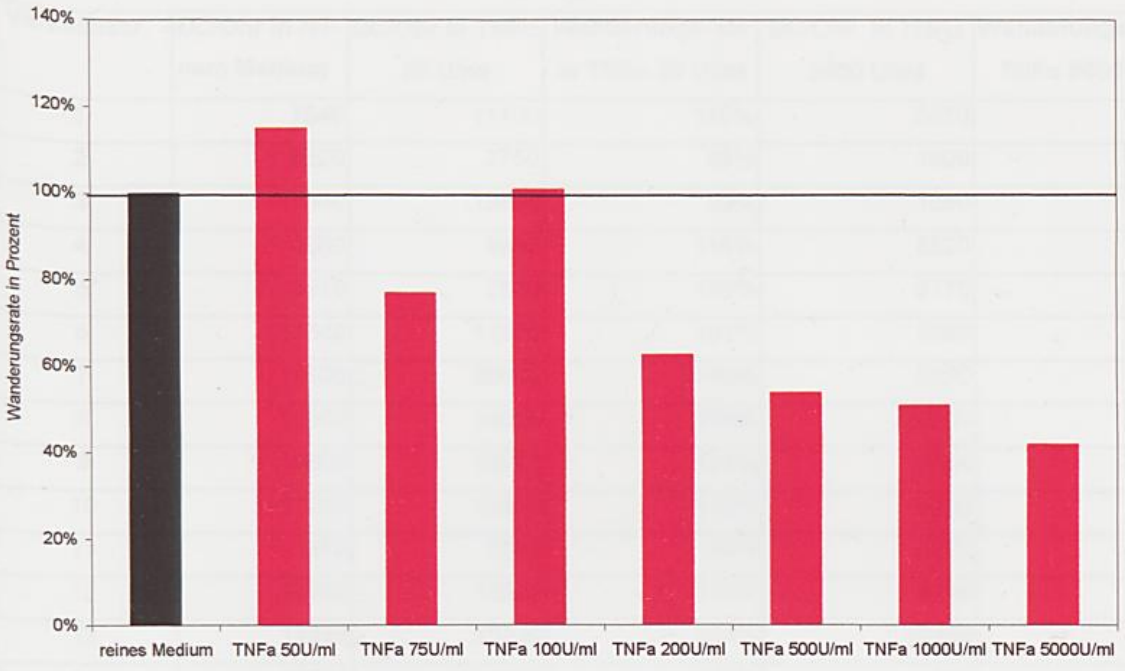


Abb. 7: TNFα wirkt in niedriger Dosis migrationsfördernd (50 U/ml) und in hohen Dosen (ab 200 U/ml) migrationshemmend (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 8).

Aus diesem Versuchsansatz ist ersichtlich, daß TNFα unterschiedliche Wirkung auf die Emigration der kutanen dendritischen Zellen hat (Tab. 8, Abb. 7). In niedriger Dosis, das heißt in einer Konzentration von 50 U/ml, fördert TNFα die Wanderung der Zellen (siehe auch C 2.2.2). Bereits ab einer Konzentration von 75 U/ml bis 100 U/ml sinkt die Auswanderungsrate auf die 100% der Kontrolle bis leicht darunter. Ab 200 U/ml findet eine immer deutlicher werdende Hemmung der Wanderung statt, die in der Folge noch weiter untersucht wurde (siehe auch C 2.2.2). Diese Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt und es zeigten sich immer die gleichen Ergebnisse. In allen weiteren Versuchen wurden deshalb TNFα 50 U/ml und TNFα 5000 U/ml als Kontrollen für die Migrationssteigerung bzw. –hemmung verwendet.

Wie unter C 2.1.1 erwähnt, wurden TNFα 50 U/ml und TNFα 5000 U/ml in allen Wanderungsstudien als Kontrollen verwendet. Daher war es möglich, die Wanderungsraten aus 32 Versuchen statistisch auszuwerten.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung aller TNFα-Daten (50 U/ml bzw. 5000 U/ml) aus 32 Versuchen

Versuchsnr.	DC/Ohr in reinem Medium	DC/Ohr in TNFα 50 U/ml	Wanderungsrate in TNFα 50 U/ml	DC/Ohr in TNFα 5000 U/ml	Wanderungsrate in TNFα 5000 U/ml
1	7840	11400	145%	5570	71%
2	6820	3750	48%	1800	23%
3	13860	13690	99%	1580	11%
4	8380	9680	116%	5520	66%
5	3970	7880	199%	2770	70%
6	11640	11800	101%	5380	46%
7	14100	20600	146%	5020	36%
8	15900	16800	106%	12400	78%
9	16800	16900	101%	10100	60%
10	11250	12920	115%	5800	52%
11	11370	9560	84%	5070	45%
12	10730	12320	115%	5110	48%
13	17370	26530	153%	12100	70%
14	21000	35980	171%	11560	55%
15	8460	13650	161%	9970	118%
16	10970	9090	83%	5200	47%
17	5380	7310	136%	2300	43%
18	10130	17650	174%	5200	51%
19	10850	15030	139%	5230	48%
20	7480	8450	113%	4290	57%
21	8880	5860	66%	2100	24%
22	10420	5460	52%	4200	45%
23	11640	11270	97%	2900	25%
24	10990	19530	178%	6830	62%
25	6040	7630	126%	2660	44%
26	15740	18880	120%	13780	88%
27	15050	18420	122%	7570	50%
28	8810	8810	100%	2580	29%
29	15060	28230	188%	10860	72%
30	10690	11640	109%	6480	61%
31	13260	16150	122%	3640	28%
32	13750	23080	168%	6500	47%
Mittelwert	11400	14250	124%	6000	52%
St.abw.	3750	7050	37%	3330	21%
Anzahl	32	32	32	32	32
Maximalwert	21000	35980	199%	13780	118%
Minimalwert	3970	3750	48%	1580	11%
T-Test		$p < 0,0007$	$p < 0,0007$	$p < 0,0001$	$p<0,0001$

Legende: Mausstämme: C57BL/6 und BALB/c, sowohl weiblich als auch männlich; Vorinkubation: 26-28h/ +4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; ein-bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.Student`s t-Test gepaart.

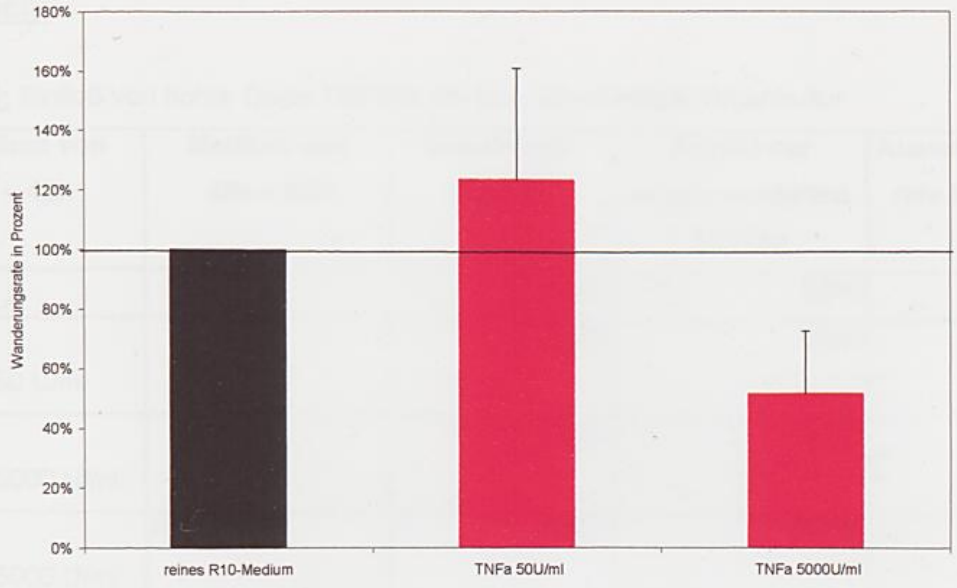


Abb. 8: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung aus Tab. 9

Aus Tab. 9 und Abb. 8 ist ersichtlich, daß TNFα 50 U/ml die Migrationsrate um 24% steigerte, wobei in einzelnen Experimenten eine Steigerung um bis zu ca. 90% möglich war. Die hohe Dosis von TNFα 5000 U/ml konnte die Wanderungsrate um beinahe 48% vermindern. Die Schwankungen bei der niedrigen Dosis TNFα kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß bei Verwendung von kleinen Mengen des Zytokins leichter Pipettierfehler auftraten als bei der hohen Dosis. Weitere Fehlerquellen liegen bei der Zählmethode und der Aufarbeitung der Zellen (siehe D 11).

2.1.2 Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen von TNFα:

Es ist bekannt, daß TNFα in niedrigen Dosen immunstimulierend und somit entzündungsfördernd wirkt, in hohen Dosen aber, wie sie beim septischen Schock auftreten, zum Tod führen kann. Deshalb wurde in mehreren Versuchen der Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen TNFα (5000 U/ml) genauer untersucht.

Zu diesem Zweck wurden dorsale Ohrhälften zuerst für 48 Stunden auf R10-Medium mit bzw. ohne TNFα 5000 U/ml im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die ausgewanderten Zellen gezählt und die Ohren, die auf hoher Dosis TNFα inkubiert worden waren, für weitere 48 Stunden auf frischem R10-Medium mit und ohne TNFα 5000 U/ml in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die zwischen 48 und 96 Stunden ausgewanderten Zellen ebenfalls gezählt und in einem Funktionstest (OXMI) auf ihre T-Zell-Stimulationsfähigkeit untersucht. Die Ohrhaut wurde für Peroxidase-Färbungen zu *sheets* weiterverarbeitet.

1.Versuch:

Tab. 10: Einfluß von hoher Dosis TNFα in 48- bzw. 96-stündiger Organkultur

Medium von 0 – 48h	Medium von 48h – 96h	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
R10	-	15690	8380	100%
R10 + TNFα 50 U/ml	-	14820	9680	116%
R10 + TNFα 5000 U/ml	-	13920	5520	66%
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10	32200	21990	262%
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10 + TNFα 5000 U/ml	28060	20300	242%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h bzw. 96h/ 37°C, Ohren nach 48h auf TNFα 5000 U/ml auf frisches Medium R10 und einmal mit TNFα 5000 U/ml aufgelegt und für weitere 48h inkubiert; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

2.Versuch:

Tab. 11: Einfluß von hoher Dosis TNFα auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen

Medium von 0 - 48h	Medium von 48h – 96h	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
R10	-	65630*	15100	100%
R10 + TNFα 5000 U/ml	-	59690*	9950	66%
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10	70830*	21900	145%
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10 + TNFα 5000 U/ml	60920*	21800	144%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h bzw. 96h/ 37°C, Ohren nach 48h auf TNFα 5000 U/ml auf frisches Medium R10 und einmal auf TNFα 5000 U/ml aufgelegt; einmalige Zählung in 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten, daher große Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben

1.Versuch:

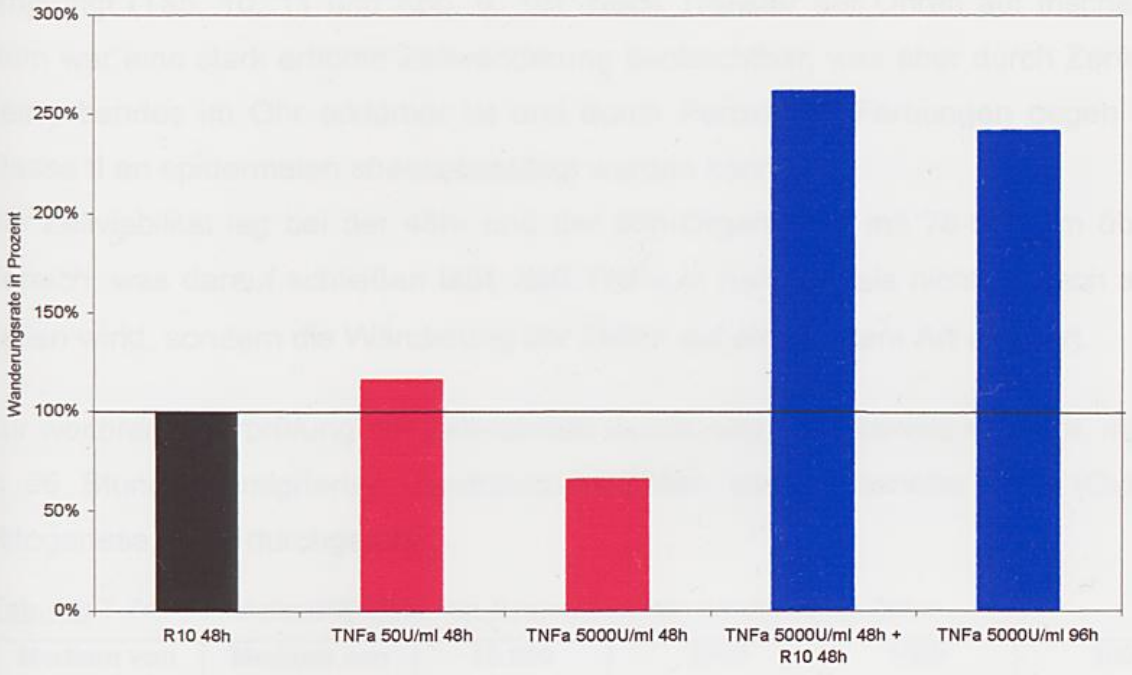


Abb. 9: TNFα 5000 U/ml wirkt hemmend auf die Migration, ist aber nicht toxisch, da nach 96h immer noch viable Zellen auswandern (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 10).

2. Versuch:

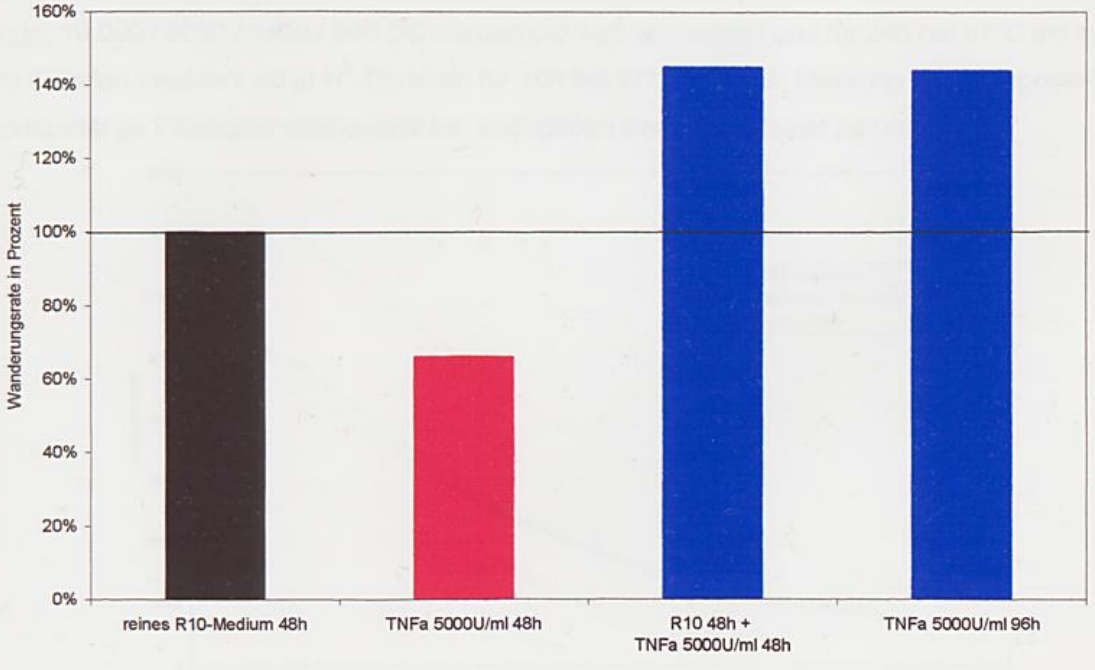


Abb. 10: Auch bei diesem Versuch nach 96h-Kultur viele viable dendritische Zellen im Medium (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 11).

In beiden Versuchen waren die Zellzahlen nach Zugabe von TNFα 5000 U/ml erniedrigt (Tab. 10, 11 und Abb. 9, 10). Nach Transfer der Ohren auf frisches Medium war eine stark erhöhte Zellwanderung beobachtbar, was aber durch Zerfall des Zellverbandes im Ohr erklärbar ist und durch Peroxidase-Färbungen gegen MHC-Klasse II an epidermalen *sheets* bestätigt werden konnte.
Die Zellviabilität lag bei der 48h- und der 96h-Organkultur mit 78-92% im üblichen Bereich, was darauf schließen läßt, daß TNFα in hoher Dosis nicht toxisch auf die Zellen wirkt, sondern die Wanderung der Zellen auf eine andere Art inhibiert.

Zur weiteren Überprüfung der Zellviabilität wurde, wie oben bereits erwähnt, mit den in 96 Stunden emigrierten dendritischen Zellen ein funktioneller Test (Oxidative Mitogenese, (59)) durchgeführt.

Tab. 12: T-Zell-Stimulationsfähigkeit von ausgewanderten dendritischen Zellen

Medium von 0 – 48h	Medium von 48 – 96h	10.000 DC/well	3000 DC/well	1000 DC/well	300 DC/well
R10	R10	49780	24760	11700	6990
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10	69940	45840	24720	11430
R10 + TNFα 5000 U/ml	R10 + TNFα 5000 U/ml	45250	24870	12820	7660

Legende: 10.000 / 3000 / 1000 / 300 DC wurden pro well ausplattiert und für 24h bei 37°C mit syngenen T-Zellen inkubiert; 50 µl H^3-Thymidin für 16h bei 37°C pro *well*; Messung der inkorporierten Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler; angegeben sind cpm (*counts per minute*).

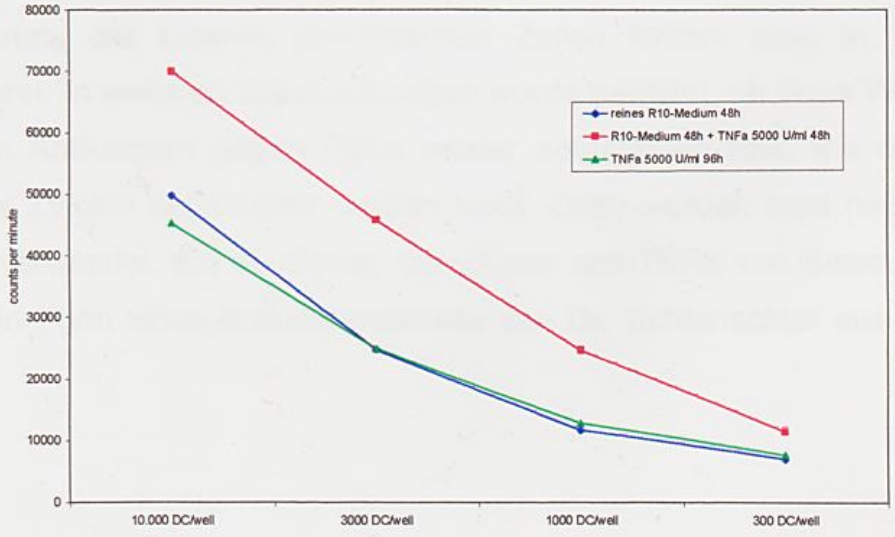


Abb. 11: Die in Gegenwart von TNFα 5000 U/ml emigrierten Zellen zeigten gleiche bzw. stärkere T-Zell-Stimulationsfähigkeit wie die in reines Medium ausgewanderten dendritischen Zellen (Daten aus Tab. 12).

Dendritische Zellen aus Kulturen mit der hohen Dosis TNFα zeigten im Vergleich zu dendritischen Zellen, die in reines R10-Medium ausgewandert waren, keine Verminderung ihrer Fähigkeit, ruhende T-Zellen zu aktivieren. Im Gegenteil, das in Tab. 12 dargestellte Einzelexperiment zeigte sogar einen positiven Effekt des TNFα. Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, daß die verminderte Emigration von kutanen dendritischen Zellen in Gegenwart von hohen Dosen TNFα nicht auf eine mögliche Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß TNFα 50 U/ml die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern kann. Dieser Vorgang dürfte *in vivo* sehr ähnlich ablaufen, denn beim Eindringen von Bakterien in die Haut wird die TNFα-Produktion induziert. Im Gegensatz dazu wirkt TNFα in hohen Dosen hemmend auf die Wanderung, wobei dies nicht auf eine mögliche Toxizität des Zytokins zurückzuführen ist.
Die in diesen Versuchen verwendete Ohrhaut wurde nach der Kultur in Immunfluoreszenzfärbungen auf morphologische Unterschiede hin analysiert. Die Ergebnisse sind unter Punkt C 2.1.4 angeführt.

2.1.3 Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNFα in die Kultur hemmt die Migration der kutanen dendritischen Zellen:

Aus den Versuchen unter Punkt C 2.1.1 ist ersichtlich, daß TNFα in geringer Dosis die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen fördern bzw. in hoher Dosis hemmen kann. In weiteren Untersuchungen wurde getestet, ob diese Wirkung durch Zugabe von Antikörpern gegen TNFα wieder aufgehoben bzw. wie weit endogen produziertes Zytokin neutralisiert werden kann. Dazu wurden zwei neutralisierende Antikörper verwendet: ein käuflicher, gereinigter anti-TNFα von Biosource und ein Antikörper in Form eines Kulturüberstandes von Dr. Echtenachter aus Regensburg (V1q) (54).

Wirkung des käuflichen anti-TNFα von Biosource auf die Migration der Langerhanszellen:

Tab. 13: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen anti-TNFα auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
keine	12190	3970	100%
anti-TNFα (bl 150U)	17470	7070	178%
anti-TNFα (bl 450U)	2740	580	15%
TNFα 50 U/ml	19380	7880	199%
TNFα 50 U/ml + anti-TNFα (bl 150U)	7440	2410	61%
TNFα 50 U/ml + anti-TNFα (bl 450U)	6830	1520	38%
TNFα 5000 U/ml	7000	2510	63%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C, anti-TNFα: Zugabe in einer Konzentration, die laut Angaben des Herstellers 150 bzw. 450U/ml TNFα blockieren kann; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

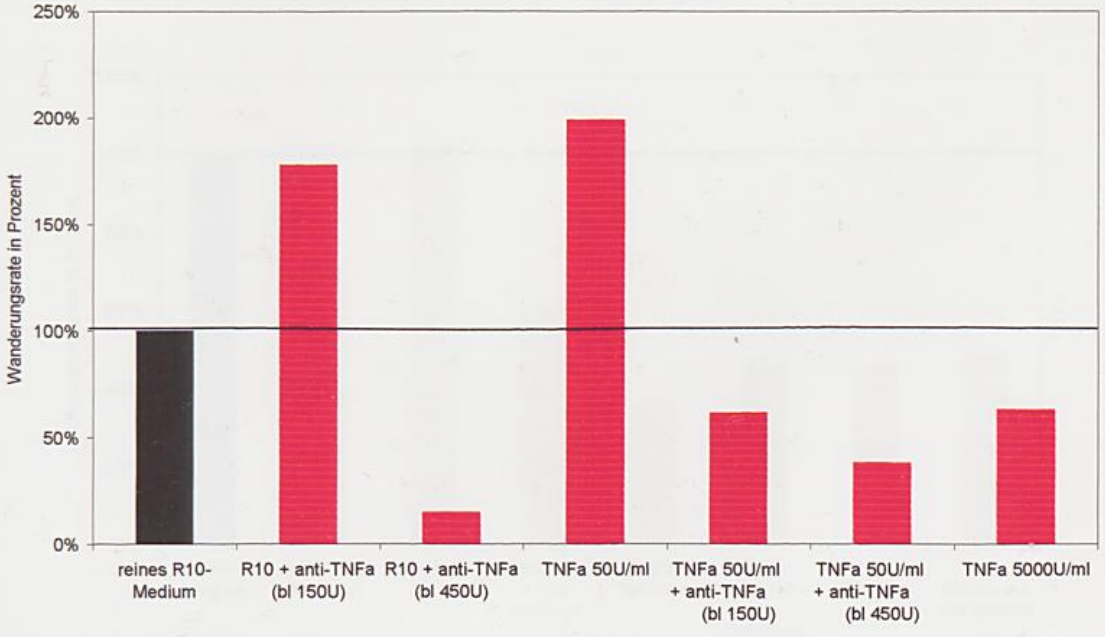


Abb. 12: Der Antikörper gegen TNFα von Biosource kann die Wirkung von TNFα aufheben (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 13).

Wirkung des supernatant anti-TNFα V1q auf die Wanderung:

In Experimenten konnten Echtenachter et al. feststellen, daß 16 µg/ml V1q (= 500 µl/ 1,5 ml) benötigt werden, um 100 U/ml rekombinanten murinen TNFα zu blocken (54). Daher wurden in den folgenden Versuchen 200 µl und 500 µl/*well* eingesetzt.

Tab. 14: Einfluß von V1q auf die Migration

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC /Ohr	Auswanderungs-rate in Prozent
keine	22010	11640	100%
V1q (500 µl/*well*)	21290	8290	71%
TNFα 50 U/ml	24350	11800	102%
TNFα 50 U/ml + V1q (200µl/*well*)	18210	7080	61%
TNFα 3000 U/ml	10000	4260	37%
TNFα 3000 U/ml + V1Qq(500µl/*well*)	11460	5320	46%
TNFα 5000 U/ml	12210	5380	46%
TNFα 5000 U/ml + V1q (500µl/*well*)	9880	5750	49%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

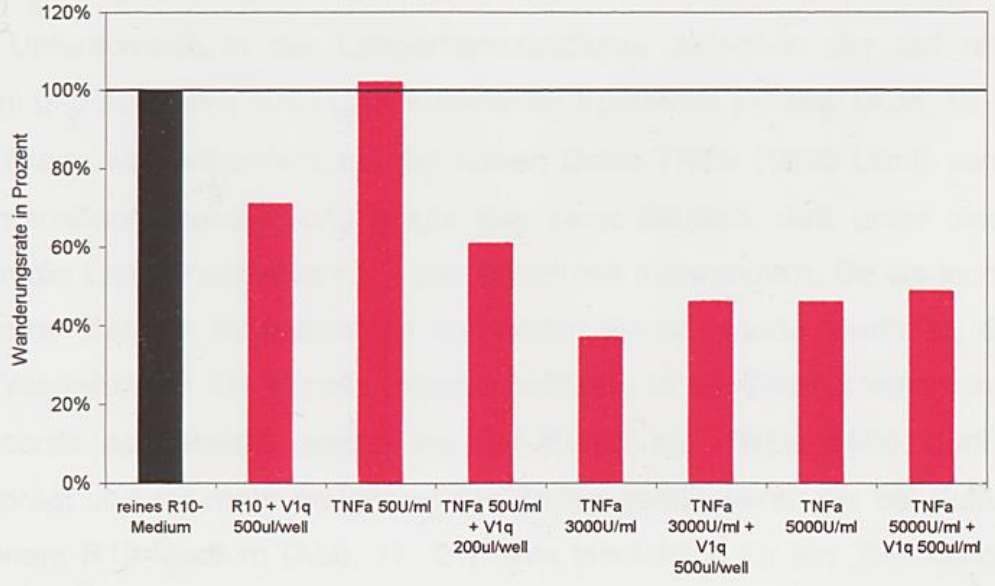


Abb. 13: V1q kann bereits in einer Konzentration von 200 µl/*well* 50 U/ml TNFα blocken, die hohen Dosen TNFα jedoch nicht mehr (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 14).

Wie erwartet, konnten beide Antikörper (Tab. 13, 14 und Abb. 12, 13) gegen TNFα die migrationsfördernde Wirkung von TNFα 50U/ml aufheben. Bei Zugabe von Antikörpern in reines R10-Medium war meistens eine leichte Senkung der Zellzahl im Medium erkennbar, was darauf hindeutet, daß *in situ* bereits genug TNFα vorhanden ist, um die Zellzahl zu erhöhen. Bei hohen Dosen TNFα (3000 U/ml und 5000 U/ml), war mit der eingesetzten Menge Antikörper kein Einfluß auf die Hemmung der Wanderung mehr möglich.

2.1.4 Morphologische Aspekte:

Nach der 48h-Kultur auf R10, TNFα 50 U/ml und TNFα 5000U/ml wurden die Ohren wie unter B 3.4 und B 3.5 beschrieben zu epidermalen und dermalen *sheets* verarbeitet und in einer Einfach-Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II gefärbt. Als zusätzliche Kontrolle wurde frische Ohrhaut mitgefärbt.
Im Fluoreszenzmikroskop waren in der Epidermis eindeutige Unterschiede in der Langerhanszelldichte vor allem zwischen frischer und kultivierter Haut erkennbar (Abb. 14, 16). Die erhöhte Auswanderungsrate bei Zugabe von TNFα 50 U/ml ins Medium war deutlich auf den epidermalen und dermalen *sheets* erkennbar (Abb. 18, 19). In der Epidermis waren kaum noch Langerhanszellen zu finden, und in der Dermis waren zahlreiche, dicht gefüllte *cords* zu sehen. Dies deutet auf eine starke Induktion der Emigration von Langerhanszellen hin. Hingegen war die verminderte Auswanderung bei Kultur auf hoher Dosis TNFα nicht klar erkennbar. Es waren kaum Unterschiede in der Langerhanszelldichte zwischen der auf reinem R10-Medium und auf TNFα 5000 U/ml kultivierten Epidermis sichtbar (Abb. 16, 20).
Diese Frage war besonders bei der hohen Dosis TNFα (5000 U/ml) von Interesse. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte hier ganz deutlich, daß unter diesen Bedingungen die Langerhanszellen aus der Epidermis auswandern. Da sie jedoch in stark reduzierter Zahl im Kulturmedium vorhanden waren, wurde vermutet, daß sie auf ihrer Wanderung in der Dermis „steckenbleiben". In der Dermis waren in kultivierter Haut *cords* ausgebildet, wobei sie bei Kultur auf TNFα 5000 U/ml deutlicher ausgeprägt und mit mehr emigrierenden Zellen gefüllt waren als bei Kultur der Haut auf reinem R10-Medium (Abb. 17, 21), was tatsächlich für ein „Steckenbleiben" der Zellen sprechen würde.

Unkultivierte Haut:

Epidermis:

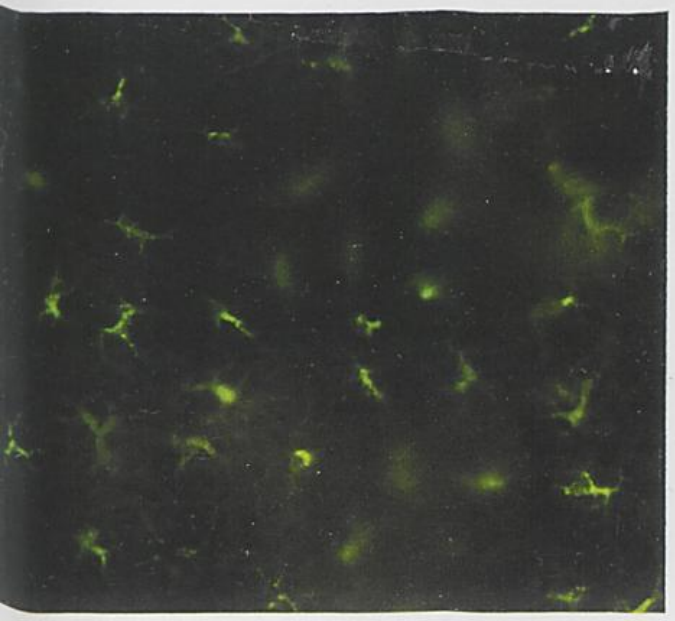


Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC bilden dichtes Netzwerk aus.

Dermis:

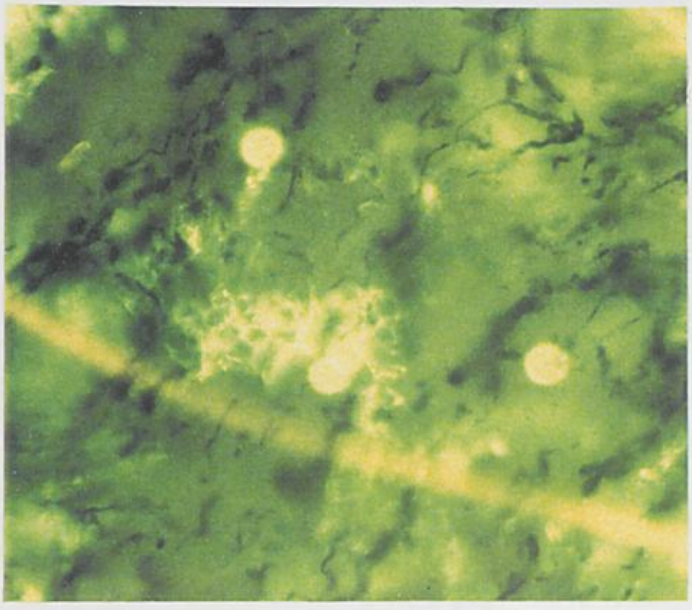


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; keine *cords* sichtbar, dermale DC sind MHC-Klasse-II-positiv.

Kontrolle R10:

Epidermis:

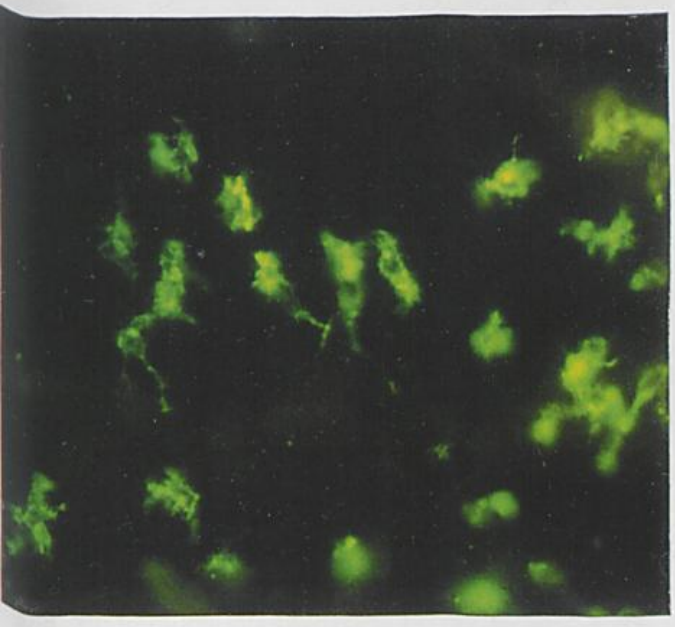


Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte verringert, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

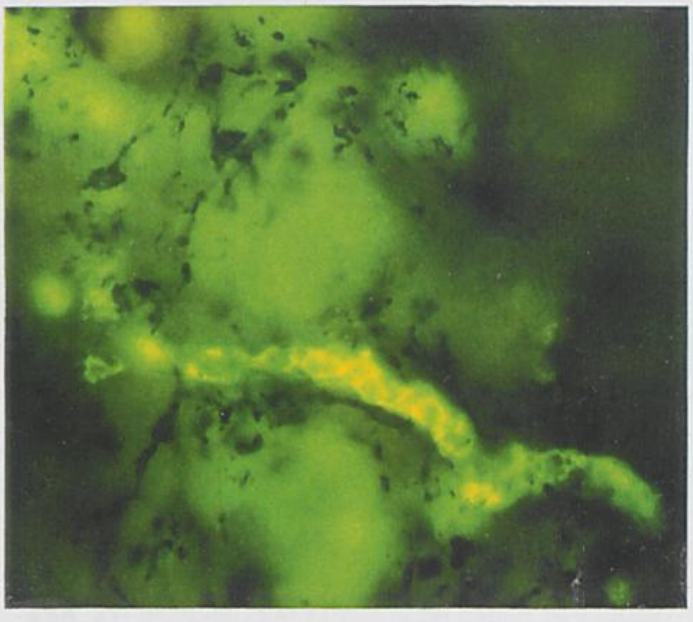


Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; deutliche *cords* ausgebildet.

TNFα 50U/ml:

Epidermis:

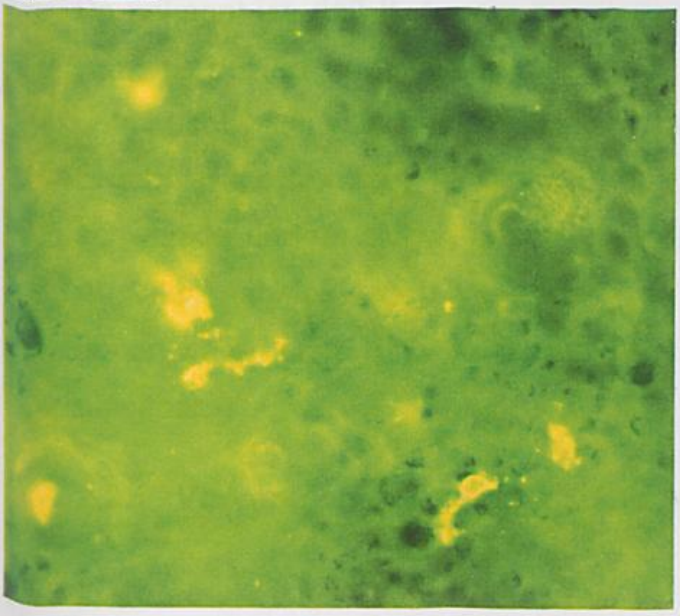


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte nimmt ab gegen die R10-kultivierte Haut, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

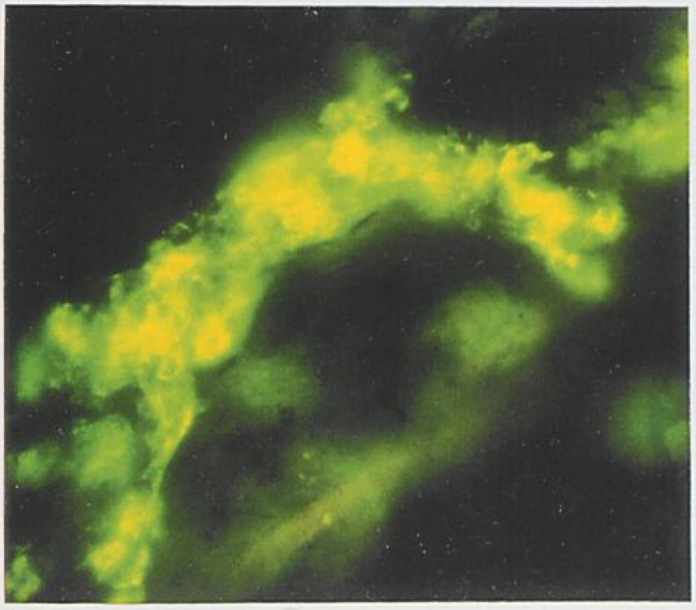


Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC in großer Zahl in den Lymphbahnen angeordnet.

TNFα 5000U:

Epidermis:

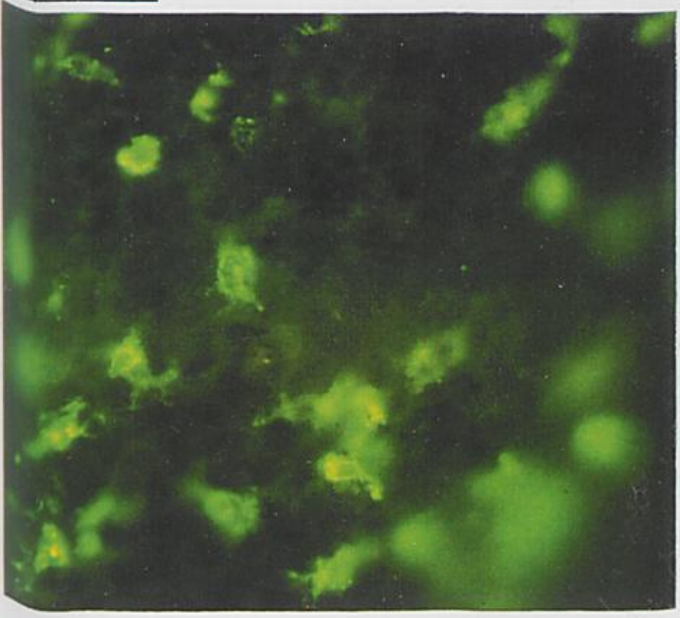


Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte ungefähr gleich wie in R10-kultivierter Haut, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

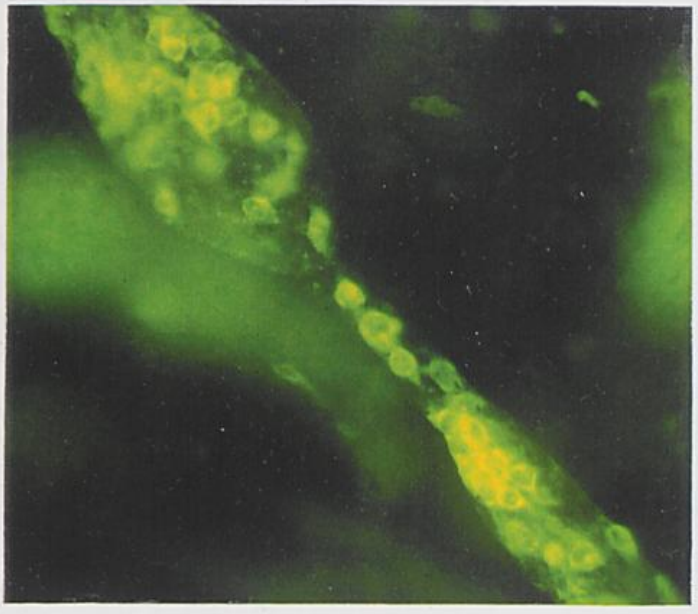


Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC in großer Zahl in den Lymphbahnen angeordnet.

2.2 Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der Langerhanszellen:

Da bekannt ist, daß IL-1α von Keratinozyten und IL-1β von Langerhanszellen in der Haut produziert wird, wurde der Einfluß von beiden Zytokinen in der Organkultur untersucht. Aus den Versuchen von Zanella (48) waren leider keine eindeutigen Ergebnisse ersichtlich, da die Zahl der auswandernden dendritischen Zellen sehr schwankte und es schwierig war, die richtigen Konzentrationen an IL-1β zu finden. Aus den nachfolgenden Versuchen von Koch und Janke mit höheren Konzentrationen waren erste Hinweise auf eine Wirkung von IL-1α und IL-1β auf die Migration ableitbar.

2.2.1 Vorversuche von Koch und Janke:

IL-1α:

Tab. 15: Einfluß von IL-1α in verschiedenen Dosen auf die Migration

Zusätze	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	9420	100%
TNFα 50 U/ml	16290	173%
TNFα 5000 U/ml	3880	41%
IL-1α 100 U/ml	10580	112%
IL-1α 500 U/ml	8580	91%
IL-1α 1000 U/ml	9880	105%
IL-1α 2500 U/ml	17790	189%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

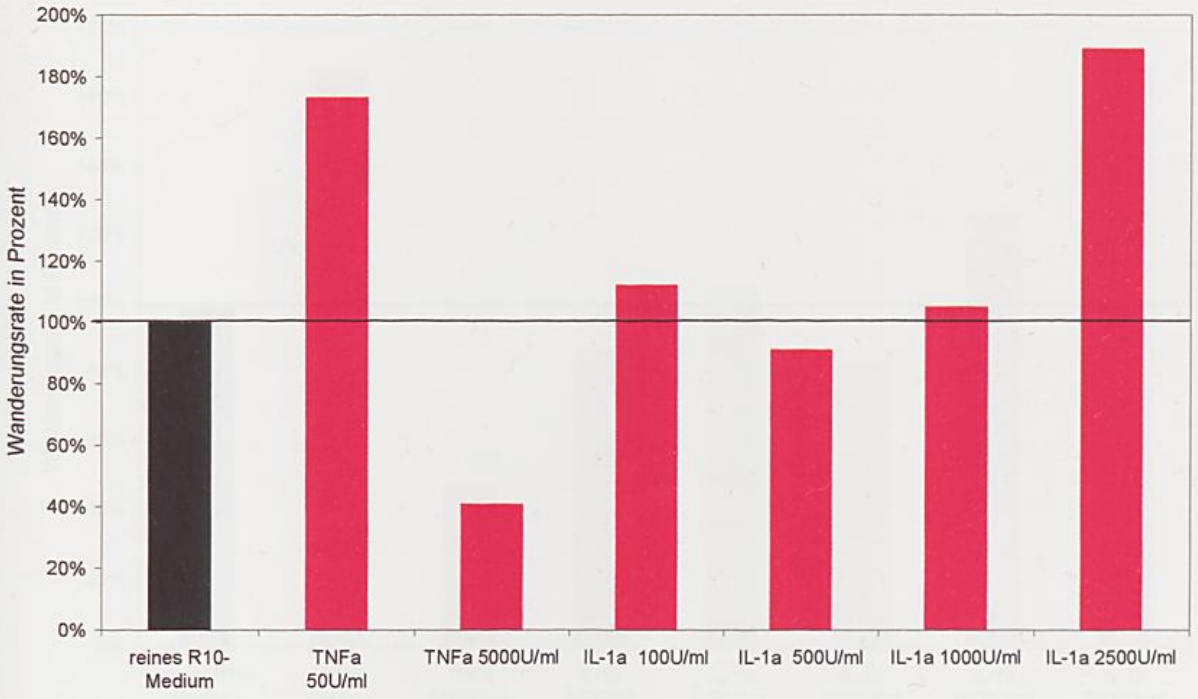


Abb. 22: IL-1α kann die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen erst in hoher Dosis (2500 U/ml) beeinflussen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 15).

IL-1β:

Tab. 16: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen IL-1β auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	13750	100%
TNFα 50 U/ml	23080	168%
TNFα 5000 U/ml	6500	47%
IL-1β 100 U/ml	11750	86%
IL-1β 500 U/ml	14330	104%
IL-1β 1000 U/ml	11420	83%
IL-1β 2000 U/ml	17500	127%
IL-1β 3000 U/ml	23330	170%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

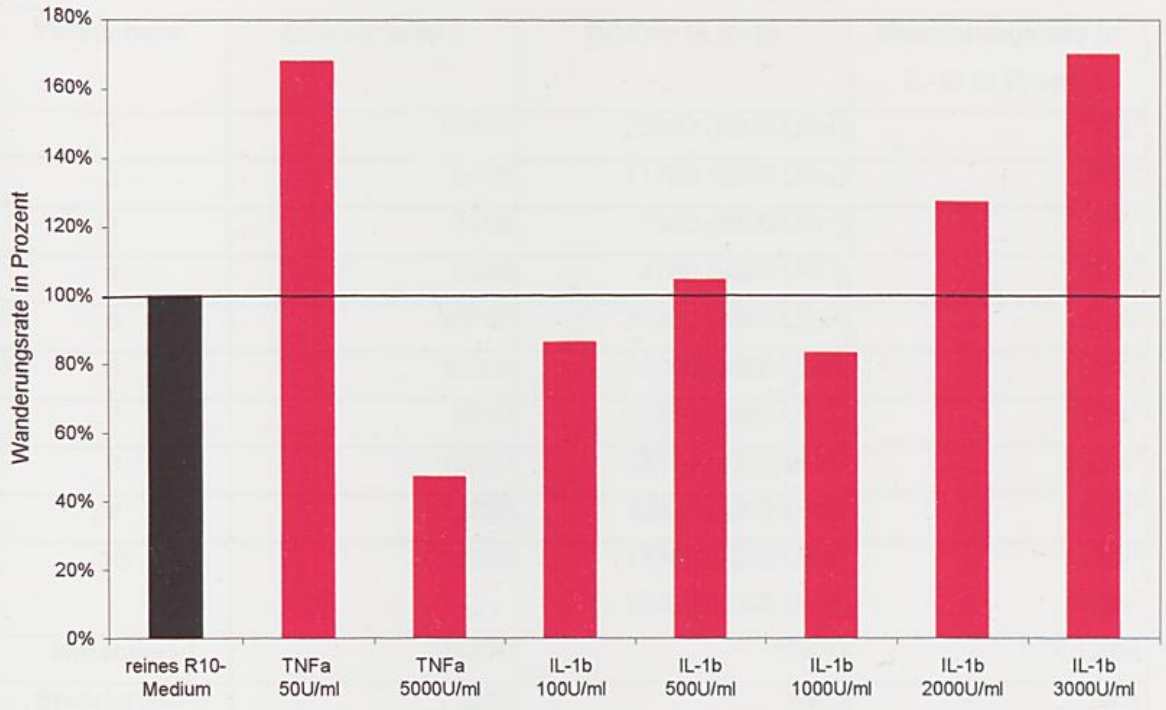


Abb. 23: IL-1β wirkt ebenfalls erst in hoher Dosis (2000-3000 U/ml) migrationsfördernd (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 16).

Aus den Tab. 15, 16 und den Abb. 22, 23 ist ersichtlich, daß sowohl IL-1α als auch IL-1β im Gegensatz zu TNFα erst in sehr hoher Dosis migrationsfördernd wirken. IL-1α erhöht die Wanderungsrate ab einer Konzentration von 2500 U/ml um 89%. In den Versuchen mit IL-1β war ab einer Konzentration von 2000 U/ml eine Erhöhung der Wanderungsrate um 27% erkennbar, die sich bei einer Konzentrationserhöhung auf 3000 U/ml noch weiter steigerte. Bei niedrigeren Konzentrationen schwankten die Zahlen der emigrierten dendritischen Zellen um den Wert der Kontrolle R10. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden in dieser Arbeit weitere Versuche mit IL-1β in hoher Dosis (2800 bzw. 3000 U/ml) durchgeführt.

2.2.2 IL-1β wirkt in hoher Dosis in der Organkultur migrationsfördernd:

Es wurden mehrere Versuche mit IL-1β, das von drei verschiedenen Firmen bezogen wurde, durchgeführt, wobei die eingesetzte Konzentration je nach erhaltener Menge 2800 U/ml oder 3000 U/ml betrug. Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die aus 10 Versuchen erhaltenen Daten geben.

Tab. 17: Auflistung aller 10 Experimente mit IL-1β in hoher Dosis

Versuchsnr.	DC/Ohr in R10	DC/Ohr in IL-1β	Wanderungsrate in IL-1β in Prozent
1	11250	20000 (2800 U/ml)	178%[1]
2	8460	11780 (2800 U/ml)	139%[2]
3	7480	5500 (2800 U/ml)	74%[1]
4	6040	4780 (3000 U/ml)	79%[3]
5	15740	25250 (3000 U/ml)	160%[3]
6	15050	13980 (3000 U/ml)	93%[3]
7	8810	10780 (3000 U/ml)	122%[3]
8	15060	18470 (3000 U/ml)	123%[3]
9	13260	19420 (3000 U/ml)	147%[3]
10	13750	17500 (2000 U/ml) 23330 (3000 U/ml)	127%[2] 170%[2]
Mittelwert	11700	15530	128%
Standardab-weichung	3280	6450	34%
Maximalwert	15740	25250	178%
Minimalwert	6040	4780	74%
T-Test		$p < 0,0070$	$p < 0,0117$

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich und männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; ein- bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.
Student´s t-test: gepaart. [1] Biomol, Hamburg, Deutschland, [2] Genzyme, Cambridge, USA
[3] PBH, Wien, Austria

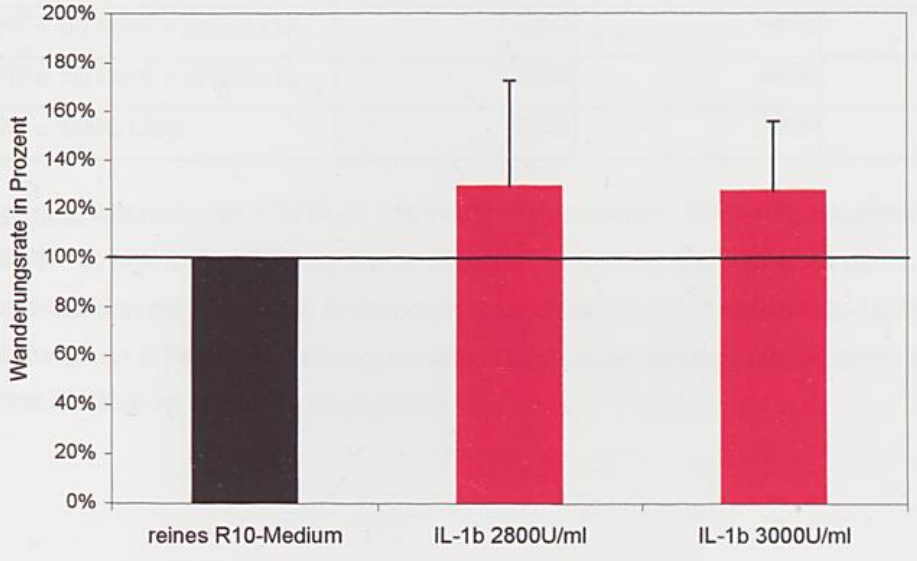


Abb. 24: Graphische Darstellung der stat. Auswertung aller 10 Versuche mit hoher Dosis IL-1β

Der Mittelwert aus allen Versuchen zeigte eine Migrationssteigerung von 28%. IL-1β kann wie TNFα die Wanderung von Langerhanszellen in der Organkultur beeinflussen, aber erst in sehr hoher Dosis steigern (Tab. 17, Abb. 24). Die Schwankungen in der Auswanderungsrate sind sehr wahrscheinlich wie bei den TNFα-Versuchen auf die Probleme des Systems, der Zählung und der Aufarbeitung der Proben zurückzuführen (D 11).

2.2.3 Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1α und IL-1β in die Organkultur verhindert eine Migrationssteigerung:

Es wurden im Laufe der Versuche Antikörper von zwei verschiedenen Firmen verwendet. Sowohl ein monoklonaler anti-IL-1β von Genzyme, als auch ein monoklonaler anti-IL-1α bzw. anti-IL-1β von R&D-Systems konnte die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen aus der Haut beeinflussen.

Tab. 18: Antikörper gegen IL-1α und IL-1β können die Migration hemmen.

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungs-rate in Prozent
keine	19360	6040	100%
anti-IL-1β	10000	3380	56%
IL-1β 3000 U/ml	13500	4780	79%
TNFα 50 U/ml	14160	7630	126%
TNFα 50 U/ml + anti-IL-1β	12250	4440	74%
TNFα 50 U/ml + anti-IL-1α	10590	4650	77%
TNFα 5000 U/ml	8390	2660	44%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, anti-IL-1α: R&D-Systems, 20 µg/ml, anti-IL-1β: Genzyme, 20 µg/ml, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen, IL-1β:PBH; einmalige Zählung von 5 Feldern in Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

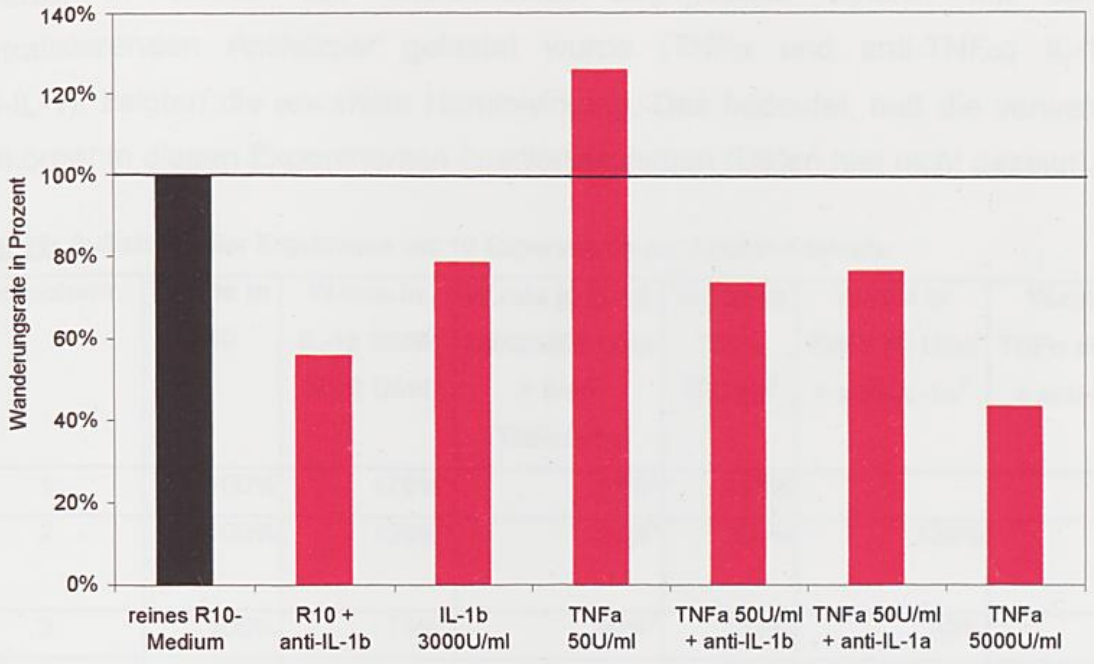


Abb. 25: Der Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen kann durch Antikörper aufgehoben werden (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 18).

Im angeführten Versuch war die Hemmung der Migration sowohl durch anti-IL-1α als auch durch anti-IL-1β eindeutig, was auf einen großen Einfluß beider Zytokine auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen hinweist (Tab. 18, Abb. 25). Auch die migrationsfördernde Wirkung von TNFα 50 U/ml konnte durch beide Antikörper aufgehoben werden. Dies deutet, gleich wie die Zugabe von anti-TNFα ins reine Medium, auf Vorkommen und Wirkung der Zytokine bereits *in situ* hin. In diesem Versuch zeigte IL-1β keine Migrationssteigerung, was durch die gleichen Probleme der Organkultur wie bei TNFα bedingt ist (D 11). Eine Kombination von IL-1β und anti-IL-1β war leider aus Kostengründen nicht durchführbar. Die Wiederholungen dieses Versuches zeigten weitgehend das gleiche Ergebnis. Weitere Versuchsergebnisse sind unter Punkt C 2.3 angeführt.

2.3 Kaskade:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von Zanella und Romani diskutierte Zytokin-Kaskade (48) weiter untersucht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mehrere Versuche mit TNFα und IL-1β in Kombination mit den jeweils anderen Antikörpern durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aus 10 Experimenten aufgelistet. Die in manchen Experimenten mitgeführten Kontroll-

ansätze, in denen das experimentell zugegebene Zytokin mit dem es neutralisierenden Antikörper getestet wurde (TNFα und anti-TNFα; IL-1 und anti-IL-1), zeigten die erwartete Hemmwirkung. Das bedeutet, daß die verwendeten Antikörper in diesen Experimenten funktioniert haben (Daten hier nicht gezeigt).

Tab. 19: Auflistung aller Ergebnisse der 10 Experimente zur Zytokin-Kaskade

Versuchsnr.	W.rate in R10	W.rate in IL-1β 2800/ 3000 U/ml	W.rate in IL-1β 2800/3000 U/ml + anti-TNFα/V1q	W.rate in TNFα 50U/ml[6]	W.rate in TNFα 50 U/ml + anti-IL-1α[7]	W.rate in TNFα 50 U/ml + anti-IL-1β
1	100%	178%[1]	67%[4]	115%	-	132%[2]
2	100%	139%[2]	134%[4]	161%	138%	152%[2] 89%[7]
3	100%	74%[1]	99%[4]	113%	89%	154%[2]
4	100%	-	-	66%	-	39%[7]
5	100%	79%[3]	106%[5]	126%	77%	74%[2]
6	100%	160%[3]	105%[5]	120%	-	-
7	100%	93%[3]	92%[5]	122%	-	-
8	100%	122%[3]	40%[5]	100%	-	-
9	100%	123%[3]	178%[5]	187%	-	-
10	100%	147%[3]	104%[5]	121%	-	-
Mittelwert	100%	124%	103%	121%	101%	107%
Standardab-weichung	0	34,1%	36,5%	30,8%	26,4%	43,9%
Maximalwert	100%	178%	178%	187%	138%	154%
Minimalwert	100%	74%	40%	66%	77%	39%
T-Test		$p < 0,041$	$p < 0,418$	$p < 0,026$	$p < 0,475$	$p < 0,340$

Legende: Maustamm: C57BL/6, sowohl weiblich als auch männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; ein- bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer; R10 mit 100% Wanderungsrate (W.rate) als Kontrolle verwendet. Student´s t-test: gepaart.

[1] ... Biomol, Hamburg, Deutschland

[2] ... Genzyme, Cambridge, USA

[3] ... PBH, Wien, Austria

[4] ... V1q von Dr. Echtenacher, Regensburg, Deutschland (54)

[5] ... anti-TNFα von Biosource, Cambridge, USA

[6] ... Dr. G.R. Adolf, Bender&Co, Wien, Austria

[7] ... R&D-Systems, Abingdon, UK

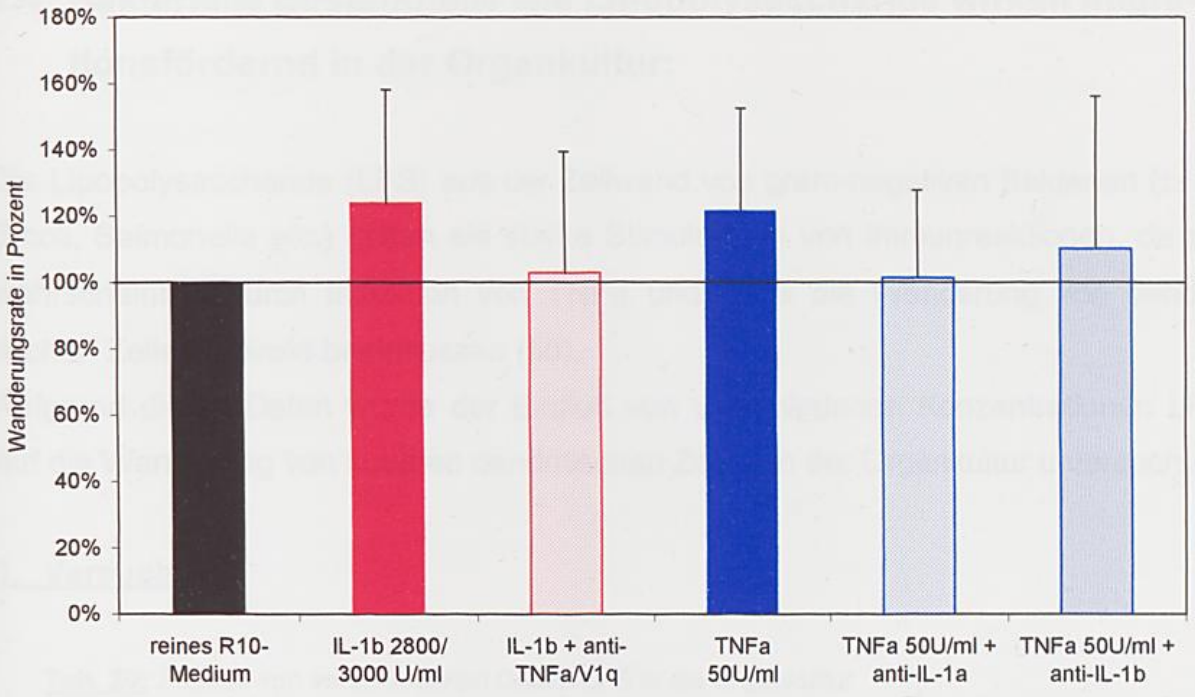


Abb. 26: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der 10 Experimente zur Zytokin-Kaskade (Daten aus Tab. 19).

Wie aus Tab. 19 und Abb. 26 ersichtlich ist, konnten sowohl TNFα als auch IL-1β in bestimmten Konzentrationen die Wanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen um mindestens 21% bis 24% steigern. Diese Wirkung konnte durch *crossblocking* mit dem jeweils anderen Antikörper beinahe auf die 100% der Kontrolle gesenkt werden. Da also die Wirkung beider Zytokine durch Zugabe von Antikörpern aufgehoben werden konnte, deutete dies nicht auf das Vorliegen einer Kaskade hin. Es muß bei diesen Experimenten erwähnt werden, daß die Unterschiede (d.h. Hemmungen der Wanderungsrate) keine statistische Signifikanz erreichten.

2.4 Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide wirken migrationsfördernd in der Organkultur:

Die Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand von gram-negativen Bakterien (z. B. E.coli, Salmonella etc.) gelten als starke Stimulatoren von Immunreaktionen, da sie wahrscheinlich durch Induktion von TNFα und IL-1α die Wanderung von dendritischen Zellen indirekt beeinflussen (50).
Aufgrund dieser Daten wurde der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur untersucht.

1. Versuch:

Tab. 20: Zugabe von verschiedenen Dosen LPS in die Organkultur

Zusätze	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	12100	5375 ± 672	100% ± 13%
LPS 10 ng/ml	10430	3140 ± 721	58% ± 13%
LPS 10 ng/ml + V1q	24210*	2880 ± 467	54% ± 9%
LPS 100 ng/ml	12200	4665 ± 375	87% ± 7%
LPS 100 ng/ml + V1q	15260	3705 ± 134	69% ± 3%
LPS 1 µg/ml	5610	1280 ± 297	24% ± 6%
anti-TNFα/V1q	37550*	4545 ± 813	85% ± 13%
TNFα 50 U/ml	19100	7310 ± 170	136% ± 3%
TNFα 5000 U/ml	8310	2295 ± 205	43% ± 4%

Legende: Mausstamm:C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27,5 h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, V1q: 500 µl/*well*, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr und Wanderungsrate sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher sehr hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

2. Versuch:

Tab. 21: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	27070	10130	100%
LPS 10 ng/ml	42190*	10460	103%
LPS 10 ng/ml + V1q	77370*	7790	77%
LPS 100 ng/ml	27910	14310	141%
LPS 100 ng/ml + V1q	48810*	12960	128%
LPS 100 ng/ml + anti-IL1α + anti-IL-1β	19900	5780	57%
LPS 1μg/ml	18500	6940	69%
anti-TNFα/V1q	64880*	8920	88%
TNFα 50 U/ml	42000	17650	174%
TNFα 5000 U/ml	20200	5200	51%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich, betäubt mit Äther; Vorinkubation: 28h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C, V1q: 500 μl/*well*, anti-IL1α + -β: von R&D-Systems, 20 μg/ml; einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher Gesamtzellzahl sehr hoch. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

Die Ergebnisse beider Versuche, die in Abb. 27 und 28 noch graphisch dargestellt sind, zeigten ähnliche Tendenzen. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS in die Organkultur führte zu einer Wanderungsrate, die sich leicht unter oder genau auf dem Kontrollniveau befand. In einer höheren Dosis von 100 ng/ml stieg die Zahl der emigrierten kutanen dendritischen Zellen bei beiden Versuchen, wobei die Werte im ersten Versuch immer noch unter der Kontrolle lagen. Die Emigration konnte bei beiden LPS-Konzentrationen (10 und 100 ng/ml) durch Zugabe von sowohl anti-TNFα (V1q) als auch anti-IL-1α und anti-IL-1β verringert werden, was auf eine direkte Wirkung von LPS auf TNFα und IL-1 schließen läßt. LPS in hoher Dosis von 1 μg/ml scheint wie TNFα in hoher Dosis einen negativen Effekt auf die Migration zu haben, da die Wanderungsrate bei beiden in gleichem Maße verringert war.

1. Versuch:

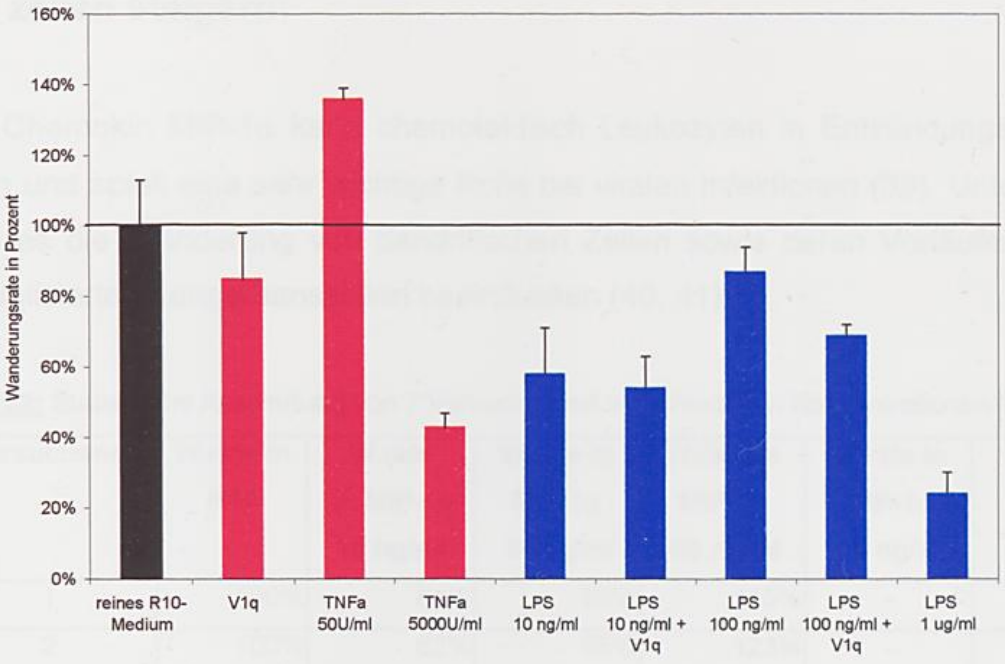


Abb. 27: Einfluß von LPS auf die Migration von kutanen dendritischen Zellen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 20).

2. Versuch:

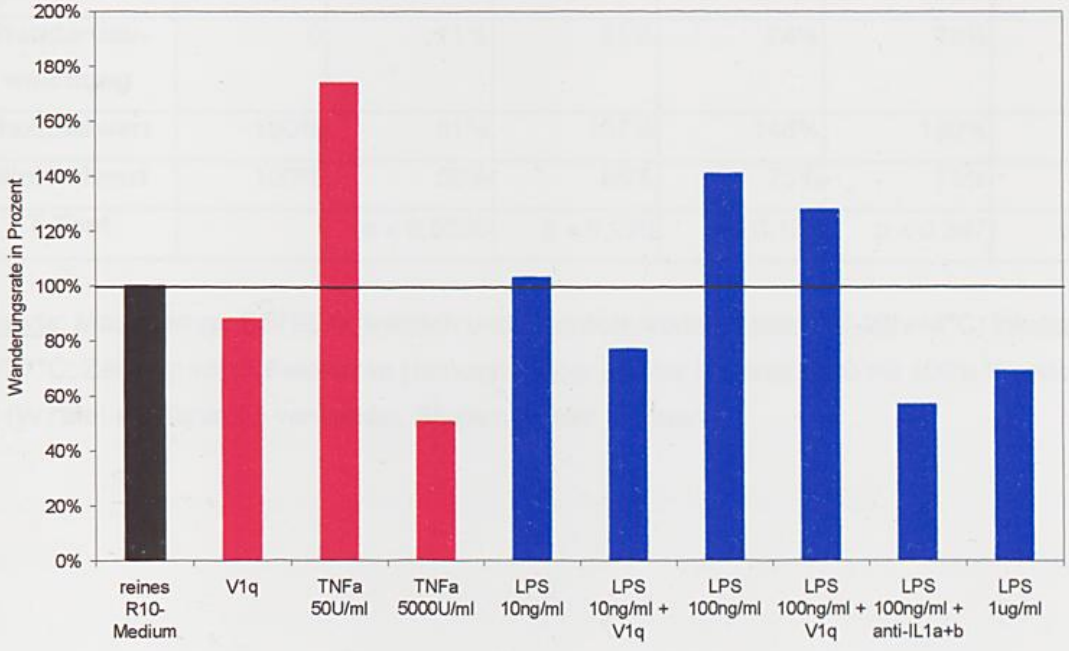


Abb. 28: LPS kann in der Organkultur migrationsfördernd wirken (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 21).

2.5 Das Chemokin MIP-1α kann die Emigration von Langerhans-zellen steigern:

Das Chemokin MIP-1α kann chemotaktisch Leukozyten in Entzündungsorte rekrutieren und spielt eine sehr wichtige Rolle bei viralen Infektionen (39). Unter anderem kann es die Wanderung von dendritischen Zellen sowie deren Vorläufern und den spezialisierten Langerhanszellen beeinflussen (40, 41).

Tab. 22: Statistische Auswertung von 7 Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen MIP-1α

Versuchsnr.	W.rate in R10	W.rate in MIP-1α 10 ng/ml	W.rate in MIP-1α 20 ng/ml	W.rate in MIP-1α 40 ng/ml	W.rate in MIP-1α 70 ng/ml	W.rate in MIP-1α 100 ng/ml
1	100%	81%	90%	115%	-	118%
2	100%	62%	85%	123%	-	109%
3	100%	-	108%	75%	-	89%
4	100%	-	91%	-	150%	-
5	100%	-	157%	148%	-	-
6	100%	56%	126%	113%	-	-
7	100%	-	-	-	75%	-
Mittelwert	100%	66%	110%	115%	113%	105%
Standardabweichung	0	11%	25%	24%	38%	12%
Maximalwert	100%	81%	157%	148%	150%	118%
Minimalwert	100%	56%	85%	75%	75%	89%
T-Test		$p < 0,0236$	$p < 0,220$	$p < 0,133$	$p < 0,397$	$p < 0,298$

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich und männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer ein- bis zweimal; R10 mit 100% Wanderungsrate (W.rate) als Kontrolle verwendet, Student´s t-test: gepaart.

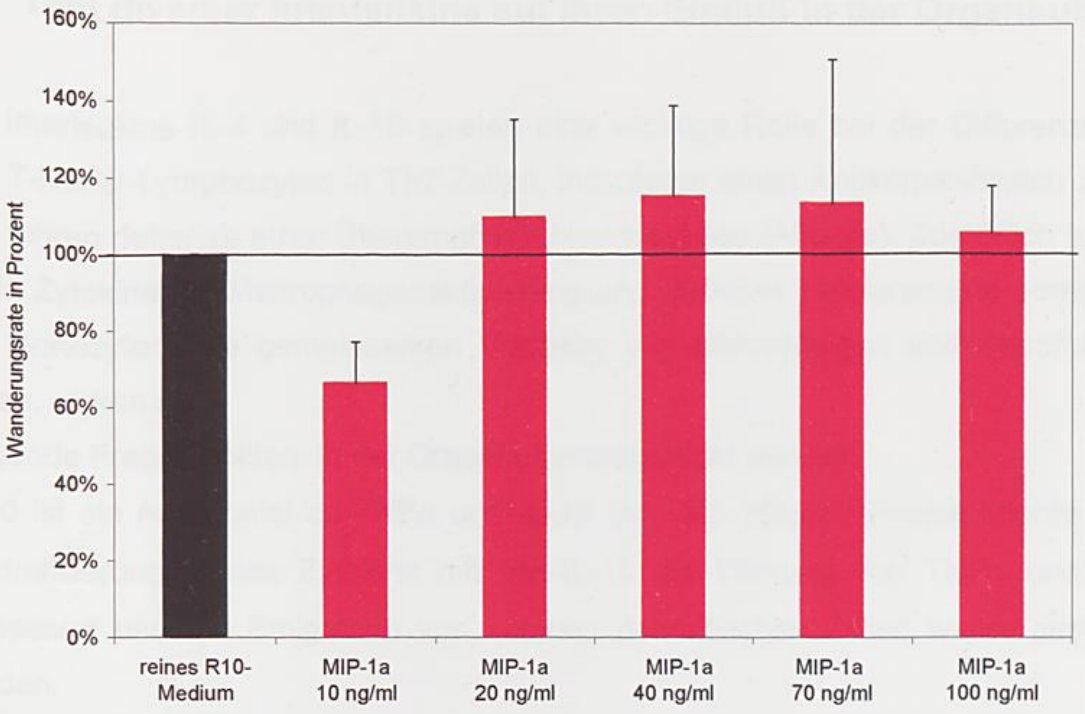


Abb. 29: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung aller Versuche mit MIP-1α (Daten aus Tab. 22).

Die Wirkung von MIP-1α scheint ähnlich wie die von TNFα und IL-1 dosisabhängig zu sein (Tab. 22, Abb. 29). Bei niedriger Konzentration, wie etwa 10 ng/ml, entsprach die Wanderungsrate der Kontrolle bzw. war leicht verringert. In einer Menge von 20 ng/ml kann MIP-1α die Emigration nur teilweise steigern, liegt aber bei der statistischen Auswertung über dem Niveau der Kontrolle. Ab einer Dosis von 40 ng/ml kann dieses Chemokin die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen fast immer fördern. Die Wanderungsrate sinkt bei hoher Dosis MIP-1α (100 ng/ml) wieder auf das Niveau der Kontrolle. Daraus kann man schließen, daß MIP-1α einen direkten (chemotaktische Rekrutierung von Vorläuferzellen aus der Dermis) oder auch indirekten Einfluß über inflammatorische Zytokine, wie über TNFα und IL-1β, auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen hat. In einem der oben aufgelisteten Experimente wurde MIP-1α 40 ng/ml in Kombination mit anti-TNFα (blockierend 150 U/ml TNFα) bzw. anti-IL-1β (20 μg/ml verwendet) eingesetzt. Bei beiden Ansätzen konnten die Antikörper die migrationsfördernde Wirkung von MIP-1α aufheben, was eher auf einen indirekten Einfluß dieses Zytokins über TNFα und IL-1β auf die Wanderung der Langerhanszellen hindeutet.

Auch bei diesen Experimenten muß erwähnt werden, daß keine statistische Signifikanz erreicht wurde und es deshalb weiterer Versuche bedarf.

2.6 Test diverser Interleukine auf ihren Einfluß in der Organkultur:

Die Interleukine IL-4 und IL-10 spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Helfer-Lymphozyten in Th2-Zellen, induzieren einen Antikörper-Switch zu IgE und führen daher zu einer Überempfindlichkeitsreaktion (Allergie). Zusätzlich können beide Zytokine die Makrophagenaktivierung und -funktion inhibieren und somit auch auf Monozyten, die gemeinsamen Vorläufer der Makrophagen und dendritischen Zellen, wirken (42).

Folgende Fragen sollten in der Organkultur untersucht werden:

IL-10 ist ein Antagonist zu TNFα und IL-1β (43, 44). Möglicherweise könnte durch Neutralisierung dieses Zytokins mit anti-IL-10 die Wirkung von TNFα und IL-1β verbessert und die Emigration von kutanen dendritischen Zellen weiter gesteigert werden.

Durch Zugabe von IL-4 in die Organkultur könnten sich eventuell Monozyten bzw. Vorläuferzellen in der Dermis oder Epidermis zu Langerhanszellen entwickeln – so, wie es in der Zellkultur für dendritische Zellen gezeigt werden konnte (62).

1. Versuch:

Tab. 23: IL-4 und anti-IL-10 haben beide einen negativen Einfluß auf die Migration in der Organkultur.

Zusätze	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	27500*	8880 ± 178	100% ± 2%
IL-4 200 U/ml	7400	2400 ± 290	27% ± 3%
IL-4 400 U/ml	17440	4360 ± 198	49% ± 2%
anti-IL-10 (10 µg/ml)	11840	3080 ± 170	35% ± 2%
anti-IL-10 (20 µg/ml)	16720	4400 ± 970	50% ± 11%
TNFα 50 U/ml	16780	5860 ± 0	66% ± 0
TNFα 5000 U/ml	8260	2100 ± 198	24% ± 2%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer; * ... einige Erythrozyten im Medium, daher höhere Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

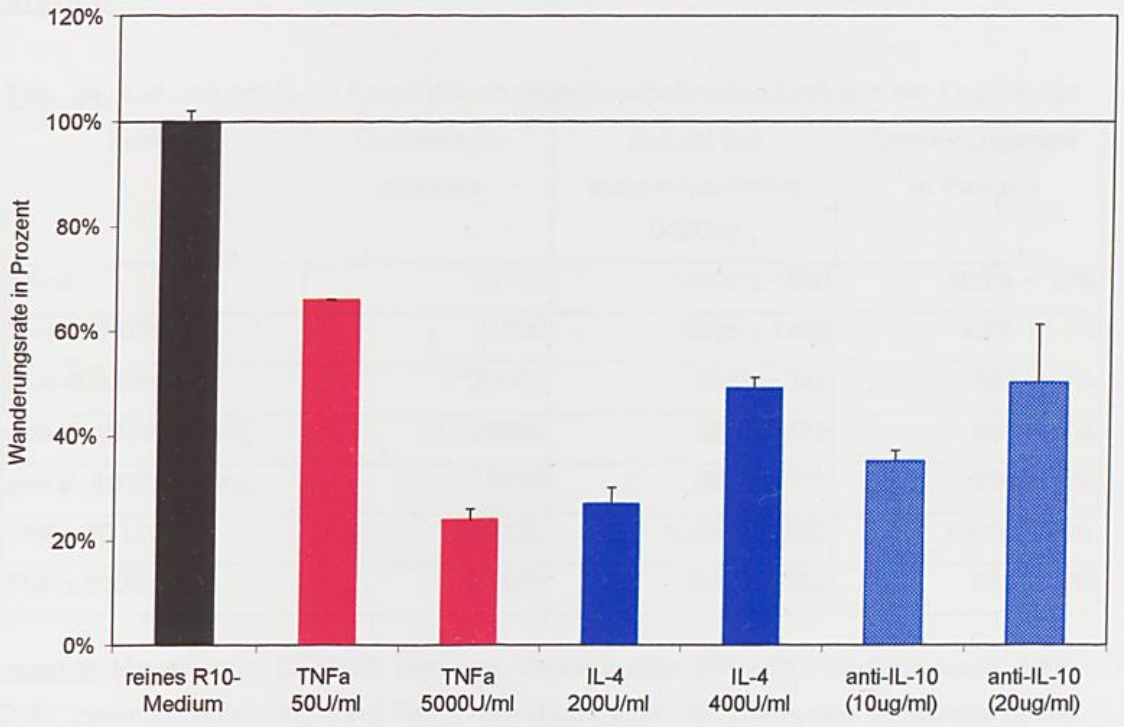


Abb. 30: IL-4 und anti-IL-10 haben einen negativen Effekt auf die Reifung und Wanderung der kutanen dendritischen Zellen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 23).

Wie aus Tab. 23 und der Abb. 30 hervorgeht, bewirkte die Zugabe von 200 U/ml IL-4 in die Organkultur im ersten Versuch eine zur Wirkung von TNFα 5000 U/ml vergleichbare Verringerung der Zellzahl. Die Verdoppelung der Dosis führte zu einer Steigerung der Wanderungsrate, die aber immer noch weit unter dem Kontrollwert lag. Unter dem Mikroskop waren sehr schöne dendritische Zellen mit deutlich ausgebildeten *veils* sichtbar.

Die gleiche Wirkung war bei Zugabe von anti-IL10 zu beobachten, da sich auch hier bei einer Konzentration von 10 µg/ml die Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen auf dem Niveau der hohen Dosis TNFα befand. Ebenso zeigte sich bei einer Verdoppelung der Dosis wie bei IL-4 eine gesteigerte Emigration der kutanen dendritischen Zellen.

2. Versuch:

Tab. 24: IL-4 und anti-IL-10 haben keinen migrationsfördernden Einfluß in der Organkultur

Zusätze	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	33100	10690 ± 1890	100% ± 18%
IL-4 200 U/ml	27820	9805 ± 1495	92% ± 14%
IL-4 400 U/ml	23050	9135 ± 345	86% ± 3%
anti-IL-10 (10 µg/ml)	29590	9225 ± 375	86% ± 4%
anti-IL-10 (20 µg/ml)	19590	5310 ± 710	50% ± 7%
TNFα 50 U/ml	29330	11640 ± 1560	109% ± 15%
TNFα 5000 U/ml	23100	6475 ± 535	61% ± 5%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Daten sind Mittelwerte beider Zählungen. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

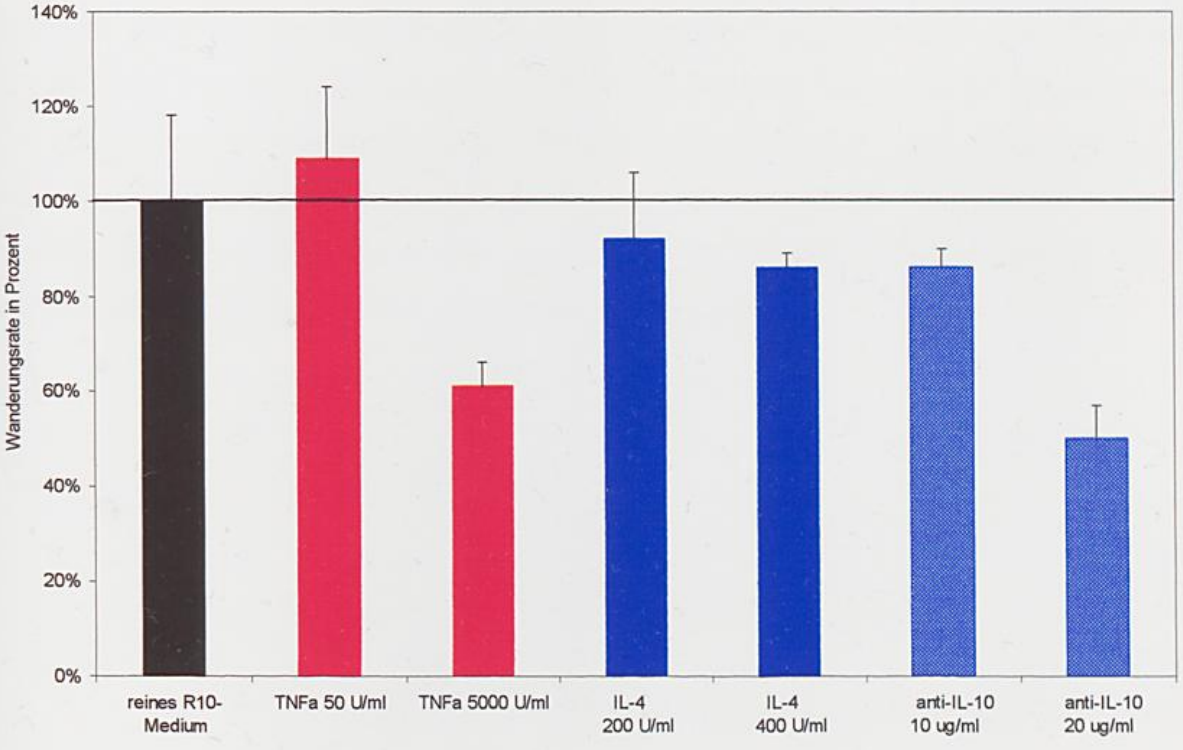


Abb. 31: IL-4 und anti-IL-10 haben keinen deutlichen Einfluß auf die Migration (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 24).

Im zweiten Experiment (Tab. 24 und Abb. 31) war die Wanderungsrate sowohl bei IL-4 als auch bei anti-IL-10 wiederum geringer als bei der Kontrolle R10, aber die Zellzahlen waren allgemein etwas höher als im ersten Versuch. Bei Zugabe von IL-4 waren wieder sehr schöne dendritische Zellen unter dem Mikroskop zu sehen.
Aus diesen beiden Experimenten kann man schließen, daß beide Interleukine in der Organkultur einen eher negativen Effekt hatten und keinesfalls zu einer Migrationssteigerung führten.
Die Wirkungslosigkeit wäre einerseits dadurch erklärbar, daß bei diesen Versuchen noch nicht die optimale Dosis verwendet wurde. Andererseits könnte es auch sein, daß beide Substanzen in der Organkultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen tatsächlich nicht beeinflussen können.

3 Untersuchung der Reifung von Langerhanszellen:

3.1 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur:

GM-CSF ist das Schlüsselzytokin für die Reifung von dendritischen und somit auch von Langerhanszellen (45, 46, 53). Die GM-CSF-Produktion wird in Keratinozyten in der Epidermis durch diverse Stimuli induziert. Die GM-CSF-Rezeptor-Expression wird durch IL-1β und TNFα verstärkt, was zu einer verbesserten Wirkung von GM-CSF und somit zur Induktion der Reifung der Langerhanszellen in der Epidermis führt. Unklar ist, ob GM-CSF auch einen Einfluß auf die Wanderung hat.

1. Versuchsansatz:

Im nachfolgenden Experiment wurde GM-CSF in zwei verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden in die Organkultur gegeben, um den Einfluß auf die Migration zu untersuchen. Parallel dazu wurden Mäuseohren nach 24-stündiger Inkubation auf Medium mit verschiedenen TNFα- und GM-CSF-Konzentrationen auf frisches Medium mit den gleichen Zytokin-Zusätzen transferiert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Zu den in den ersten 24 Stunden ausgewanderten DC wurden ins Medium entweder 1000 U/ml GM-CSF oder 100 U/ml bzw. 5000 U/ml TNFα pipettiert, um deren Wirkung auf bereits emigrierte kutane dendritische Zellen zu beobachten. Anschließend wurden die Zellen, die zwischen 0-24 und 24-28 Stunden ausgewandert waren, *gepoolt* und zusammen gezählt.

Tab. 25: Einfluß von GM-CSF auf die Migration in der Organkultur

Zusätze	Gesamtzell-zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	48500	16970	100%
TNFα 50 U/ml	61090	26870	158%
TNFα 100 U/ml	41760	17940	106%
TNFα 5000 U/ml	33270	12100	72%
GM-CSF 2000 U/ml	49880	18160	108%
GM-CSF 5000 U/ml	37980	13650	81%
keine + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	45900	16800	100%
keine + TNFα 100 U/ml zu e.DC^	51240	21690	129%
keine + TNFα 5000 U/ml zu e.DC ^	41330	17500	104%
TNFα 50 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	43500	21750	130%
TNFα 100 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	31510	12640	75%
TNFα 5000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	22400	8690	52%
GM-CSF 2000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	36240	17580	105%
GM-CSF 5000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC^	37920	18420	110%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, ^ ... GM-CSF- bzw. TNFα-Zusätze zu den in den ersten 24h emigrierten DC (e.DC), Transfer der Ohren auf frisches, gleiches Medium, poolen beider Fraktionen vor Zählung; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in den Kontrollansätzen ist jeweils als 100% angegeben.

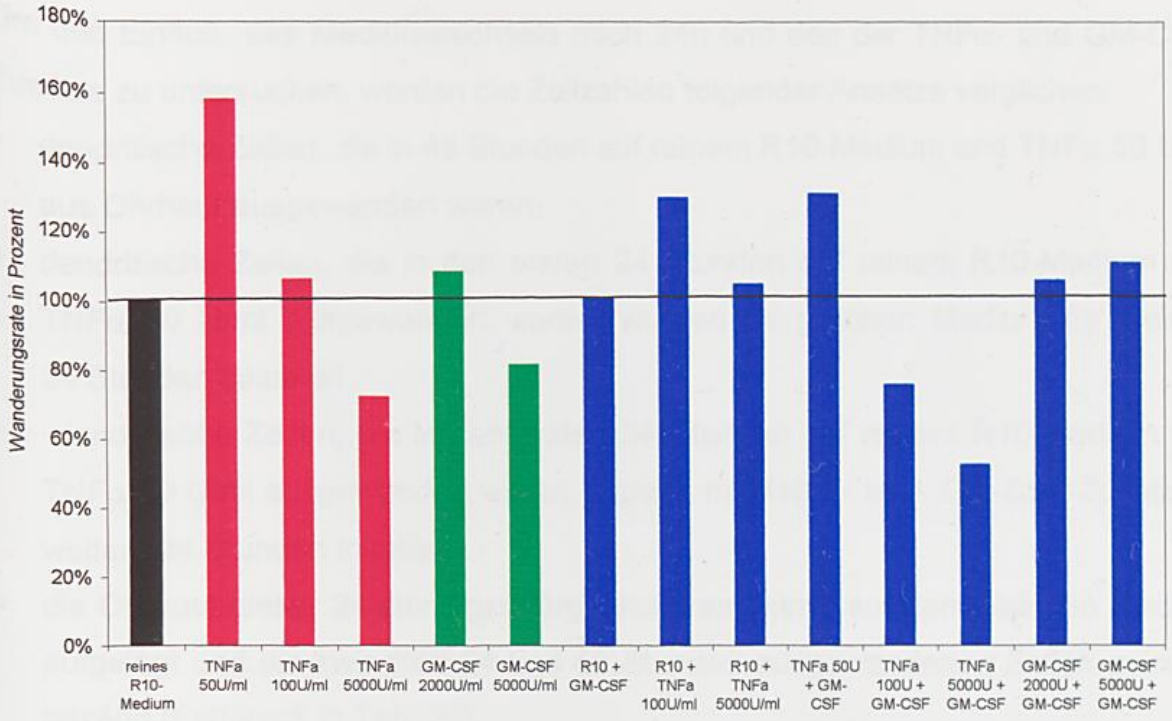


Abb. 32: GM-CSF kann bei Zugabe in die Organkultur und zu den bereits emigrierten dendritischen Zellen die Zellzahlen geringfügig erhöhen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 25).

Aus Tab. 25 und Abb. 32 ist ersichtlich, daß 2000 U/ml GM-CSF in der 48-stündigen Organkultur zu einer leichten Zellzahlerhöhung, 5000 U/ml hingegen zu einer leichten Erniedrigung führten. Die Zellzahlerniedrigung bei sehr hohen GM-CSF-Dosen von 5000 U/ml könnte auf einen negativen Effekt dieses Zytokins in zu hoher Konzentration zurückzuführen sein.

Die TNFα- und GM-CSF-Zusätze hatten auf die bereits emigrierten dendritischen Zellen eher unterschiedlichen Einfluß. Durch den Mediumwechsel nach 24h und die GM-CSF- und TNFα-Zusätze besaßen die Zellen deutlichere *veils* als die Kontrollen. Die Zellviabilität lag bei allen Ansätzen zwischen 80-90%. Interessant war, daß auch die TNFα-Zugabe zu den bereits ausgewanderten dendritischen Zellen zu einer leichten Zellzahlerhöhung führte. Bei den GM-CSF-Zusätzen waren die Zellzahlen eher schwankend. Sehr wahrscheinlich können beide Zytokine bei den bereits ausgewanderten Zellen die Überlebensrate erhöhen bzw. die Reifung der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen. Diese Ergebnisse wurden durch zwei weitere Versuche mit GM-CSF-Zusätzen in der Organkultur bestätigt

2. Versuchsansatz:

Um den Einfluß des Mediumwechsels nach 24h und den der TNFα- und GM-CSF-Zusätze zu untersuchen, wurden die Zellzahlen folgender Ansätze verglichen:

- dendritische Zellen, die in 48 Stunden auf reinem R10-Medium und TNFα 50 U/ml aus Ohrhaut ausgewandert waren,
- dendritische Zellen, die in den ersten 24 Stunden auf reinem R10-Medium und TNFα 50 U/ml ausgewandert waren, wurden im gleichen Medium für weitere 24 Stunden inkubiert
- dendritische Zellen, die in den ersten 24 Stunden auf reinem R10-Medium und TNFα 50 U/ml ausgewandert waren, wurden mit TNFα- bzw. GM-CSF-Zusatz für weitere 24 Stunden inkubiert
- die Ohrhaut dieser 24-stündigen Organkulturen wurde auf dem gleichen Medium aufgelegt und die zwischen 24 und 48 Stunden ausgewanderten Zellen getrennt gezählt (Fettdruck in Tab. 26).

Tab. 26: Vergleich der zwischen 0-24h und der 24-48h auswandernden Zellen

Medium von 0—24h, Inkubation mit Ohr	**Medium von 24—48h, Inkubation mit Ohr**	**Medium von 24—48h, Inkubation ohne Ohr**	**Gesamtzell-zahl/Ohr**	**Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr**
R10	R10	-	20160*	10535 ± 705
R10 + TNFα 50 U/ml	R10 + TNFα 50 U/ml	-	159380*	18035 ± 405
R10	-	R10	16430	7760 ± 1350
	R10		**16440**	**9500 ± 0**
R10 + TNFα 50 U/ml	-	R10 + TNFα 50 U/ml	10120	5265 ± 875
	R10 + TNFα 50 U/ml		**14630**	**8090 ± 0**
R10	-	R10 + GM-CSF 1000 U/ml[1]	19430	7745 ± 265
	R10		**19830**	**9750 ± 0**
R10	-	R10 + TNFα 50 U/ml[1]	19750	9265 ± 365
	R10		**22280**	**11450 ± 0**
R10 + TNFα 50 U/ml	-	R10+ TNFα 50 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml[1]	27900	10280 ± 0
	R10 + TNFα 50 U/ml		**24940**	**15600 ± 0**

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, 0-24h ausgewanderte Zellen, **24-48h ausgewanderte Zellen;** zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Zellzahlen sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, führt zu einer hohen Gesamtzellzahl.

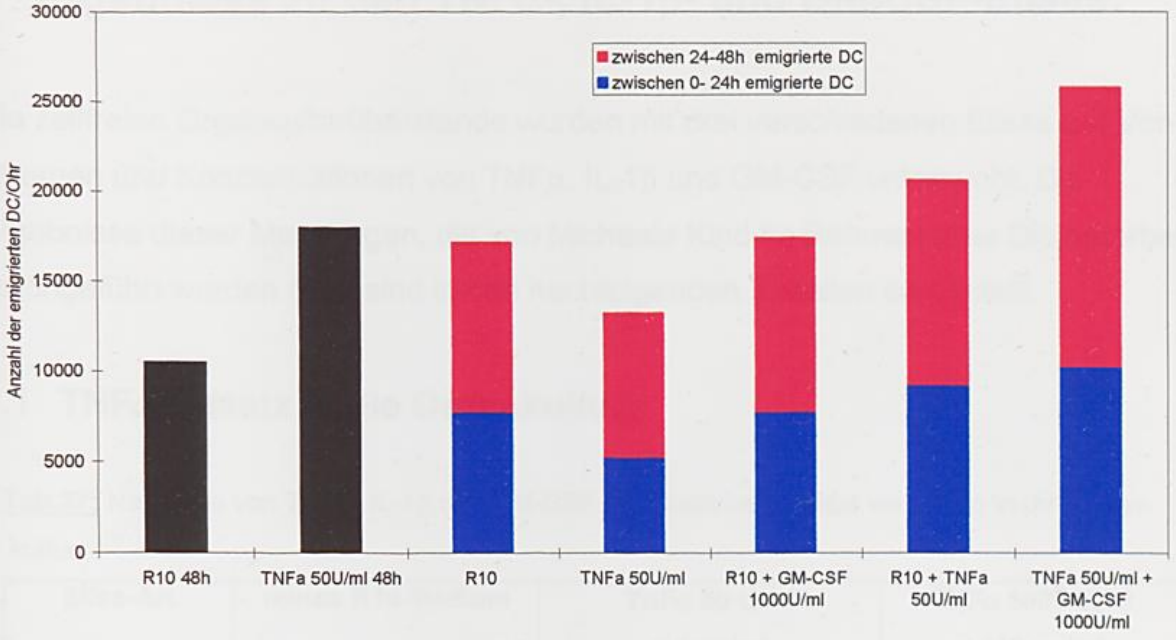


Abb. 33: Der Mediumwechsel nach 24h sowie die TNFα- und GM-CSF-Zusätze zu den bereits emigrierten dendritischen Zellen führen zu einer deutlichen Zellzahlerhöhung gegenüber der Kultur auf reinem Medium (Daten aus Tab. 26).

Durch den Mediumwechsel nach 24 Stunden kam es im Vergleich zur 48-stündigen Organkultur zu einer Zellzahlerhöhung. Der Zusatz von 50 U/ml TNFα zeigte bei einem Mediumwechsel Zellzahlerniedrigung, was aber als „Ausreißer" zu interpretieren ist (D 11). GM-CSF- und TNFα-Zugabe zu den in den ersten 24h ausgewanderten dendritischen Zellen führte zu einer Steigerung der Zellzahl mindestens im gleichen Ausmaß wie der Mediumwechsel. Aus diesem Versuch kann man unter anderem auch schließen, daß von Tag 1 bis Tag 2 der Organkultur mehr dendritische Zellen auswandern als in den ersten 24 Stunden der Kultur (Tab. 26, Abb. 33), was durch die Experimente von Ortner bestätigt wird (47).

Zusammenfassend kann man zu diesen Experimenten sagen, daß GM-CSF in der Organkultur keinen wesentlichen Einfluß auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen hat, aber die Zellzahl geringfügig erhöhen kann. Die Zugabe von TNFα und GM-CSF zu bereits emigrierten dendritischen Zellen und ein Mediumwechsel nach 24 Stunden führte ebenfalls zu Zellzahlerhöhungen, aber es traten auch starke Schwankungen auf. Sowohl TNFα als auch GM-CSF können somit die Überlebensrate der in den ersten 24 Stunden ausgewanderten DC steigern bzw. die Reifung der kutanen dendritischen Zellen induzieren.

4 Ergebnisse zu den TNFα-, IL-1β- und GM-CSF-Elisas:

Die zellfreien Organkulturüberstände wurden mit drei verschiedenen Elisas auf Vorkommen und Konzentrationen von TNFα, IL-1β und GM-CSF untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen, die von Michaela Kind im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt wurden (63), sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

4.1 TNFα-Zusatz in die Organkultur:

Tab.27: Nachweis von TNFα, IL-1β und GM-CSF mit Elisas bei Zugabe von TNFα in die Organkultur

Elisa-Art	reines R10-Medium	TNFα 50 U/ml = 4 ng/ml	TNFα 5000 U/ml = 416 ng/ml
GM-CSF	213,9 pg ± 70,8 pg	258,9 pg ± 125,1 pg	382,7 pg ± 249,0 pg
IL-1β	109,1 pg ± 54,2 pg[1]	118,5 pg ± 91,5 pg	96,7 pg ± 44,8 pg[2]
TNFα	unter 31 pg	86,6 pg ± 32,1 pg	4 - 200 ng

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse in pg/ml bzw. ng/ml; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 8; IL-1β: n = 8 , [1] ... 2 Messungen (M) unter 31 pg , [2] ... 1 M unter 31 pg; TNFα: n = 11; Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Zytokine, die sich während der 48-stündigen Organkultur im Medium akkumulierten, wurden gemessen. Die Ergebnisse beim GM-CSF-Elisa deuteten auf eine Zunahme an GM-CSF in den Kulturüberständen mit steigender TNFα-Konzentration hin. Daraus kann man auf eine Induktion der GM-CSF-Produktion durch TNFα schließen. Bei IL-1β schwankten die Werte bei steigender Menge an zugegebenem TNFα in die Organkultur um ungefähr den gleichen Wert (100 pg/ml), was darauf hindeutet, daß TNFα die Produktion bzw. den Verbrauch von IL-1β nicht beeinflußt. Im TNFα-Elisa waren wie erwartet zunehmende TNFα-Mengen nachweisbar, aber nicht in den Konzentrationen, die in die Kultur gegeben worden waren (4 und 416 ng/ml). Dies ist wahrscheinlich auf einen starken Verbrauch an TNFα oder Probleme beim Nachweis des exogenen TNFα zurückzuführen.

4.2 IL-1β-Zusatz in der Organkultur:

Tab. 28: GM-CSF-, TNFα- und IL-1β-Nachweis mit Elisas bei Zugabe von IL-1β in die Organkultur

Elisa-Art	reines R10-Medium	IL-1β 2800 - 3000 U/ml = 280 - 300 ng/ml
GM-CSF	147,9 pg ± 32,7 pg	242,4 pg ± 84,0 pg
IL-1β	136,4 pg ± 91,5 pg[1]	1 - 323 ng
TNFα	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse in pg/ml und ng/ml; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 2; IL-1β: n = 6, [1] ... 1 M unter 31 pg; TNFα: n = 4, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Wie bei der Zugabe von TNFα ins Medium erhöhte sich auch hier die Menge an GM-CSF, wenn IL-1β in die Organkultur zugegeben wurde. Das läßt vermuten, daß die vermehrte GM-CSF-Produktion sowohl durch TNFα als auch durch IL-1β induzierbar ist. IL-1β war annähernd in den eingesetzten Mengen nachweisbar. Im Gegensatz dazu war TNFα weder in der Kultur mit reinem Medium noch bei IL-1β-Zugabe meßbar.

4.3 GM-CSF-Zusatz in die Organkultur:

Tab.29: GM-CSF-, TNFα- und IL-1β-Nachweis mit Elisas bei Zugabe von GM-CSF in die Organkultur

Elisa-Art	R10	GM-CSF 2000 U/ml =105 ng/ml	GM-CSF 5000 U/ml =263 ng/ml
GM-CSF	165,2 pg ± 81,2 pg	400 pg - 9,8 ng	490 pg - 10,6 ng
IL-1β	56,2 pg	unter 31 pg	-
TNFα	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse oder einmalige Messungen; GM-CSF: n = 6; IL-1β und TNFα: n = 1, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Bei diesen Messungen waren die eingesetzten Mengen an GM-CSF nicht detektierbar, was möglicherweise für einen hohen Verbrauch an GM-CSF spricht. IL-1β und TNFα waren nicht nachweisbar, wobei bei beiden Zytokinen nur jeweils eine Messung durchgeführt worden war.

4.4 Lipopolysaccharide als Stimulator in der Organkultur:

Tab.30: GM-CSF-, TNFα- und IL-1β-Nachweis mit Elisas bei Zugabe von LPS in die Organkultur

Elisa-Art	R10	LPS 10 ng/ml	LPS 100ng/ml	LPS 1 µg/ml
GM-CSF	276 pg ± 74,7 pg	293,5 pg ± 102,5 pg	287,2 pg ± 106,3 pg	321,0 pg ± 122,0 pg
IL-1β	127,7 pg ± 27,1 pg[1]	143,3 pg ± 49,3 pg	158,6 pg ± 57,4 pg[1]	135,0 pg ± 101,1 pg
TNFα	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 4; IL-1β: n = 3, [1] ... 1 M unter 31 pg; TNFα: n = 3, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Auch hier war eine leichte, aber nicht so eindeutige GM-CSF-Zunahme bei steigender LPS-Konzentration zu beobachten. Bei den IL-1β-Messungen war ebenfalls eine Zunahme der Menge zu erkennen, aber die Werte lagen sehr eng beeinander. Die TNFα-Konzentrationen befanden sich wieder unterhalb der Nachweisgrenze.

5 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen:

5.1 Nachweis von zwei DC-Markern (In-1, 2A1) auf LC und dermalen dendritischen Zellen *in situ* und *in vitro*:

Wie unter B 3.4, 3.5, 3.6 und 3.7 beschrieben, können Langerhanszellen in Suspension und in der Ohrhaut mit Hilfe von MHC-Klasse II identifiziert und zusätzlich auf andere Marker untersucht werden. Dazu wurden in dieser Versuchsreihe zwei Marker für dendritische Zellen verwendet. Der erste Antikörper (In-1) kann an die invariante Kette, ein Molekül, das bei der Produktion von MHC-Klasse-II-Molekülen benötigt wird, binden (55). Der zweite Antikörper (2A1) dient zum Nachweis eines noch unbekannten Moleküls, das als Reifungsmarker gilt (53). Die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenz- Doppelfärbungen wurden in nachstehender Tabelle 31 aufgelistet und in einigen Fotos dargestellt (Abb. 34-37).

Tab. 31: Übersicht über das Vorkommen von In-1 und 2A1 auf Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen *in situ* und *in vitro*

	MHC II (2G9-FITC)	In-1	2A1
unkultivierte Epidermis	+	++	-
kultivierte Epidermis (R10, 48h)	+++	+	+
unkultivierte Dermis	+++	+	+
kultivierte Dermis (R10,48h)	+++	+	+
unkultivierte EC-Suspension	+	+	-
kultivierte EC-Supension (72h)	+++	+	+
emigrierte kutane DC (R10, 48h)	+++	+	+

Eine Färbung der invarianten Kette konnte mit dem Antikörper (In-1) in allen frisch präparierten und kultivierten Hautproben durch Bindung an Langerhanszellen der Epidermis und an dermale dendritische Zellen beobachtet werden. Die deutlichste Färbung war auf der frischen, unkultivierten Epidermis zu sehen, da hier die Expression der invarianten Kette bei unreifen, prozessierenden dendritischen Zellen am größten ist (Abb. 34a,b). In den unkultivierten EC-Suspensionen waren die aus der Haut isolierten Langerhanszellen und die reifen dendritischen Zellen nach Kultivierung, die scheinbar noch Restmoleküle von invarianter Kette besaßen oder teilweise noch nicht ausgereift waren, mit In-1 nachweisbar. Auch in den Organkulturüberständen konnten mit diesem Antikörper die emigrierten kutanen dendritischen Zellen, die ebenfalls restliche Moleküle der invarianten Kette aufwiesen, sichtbar gemacht werden.

Der Reifungsmarker 2A1 war in der kultivierten Epidermis erwartungsgemäß nur noch auf einigen wenigen LC, die reifenden, auswandernden Langerhanszellen entsprachen, exprimiert. In kultivierten EC-Suspensionen und in den Organkulturüberständen konnte dieser Antikörper an reife dendritische Zellen binden (Abb. 35a,b). Einige Zellen in der unkultivierten Dermis wiesen ebenfalls diesen Marker auf – möglicherweise dermale dendritische Zellen.

Die Auswanderung von reifenden und bereits gereifen Langerhanszellen war deutlich erkennbar, da in den *cords* der kultivierten Dermis MHC-Klasse-II-positive Zellen, die noch In-1 oder den Reifungsmarker 2A1 exprimierten, zu sehen waren (Abb. 36, 37).

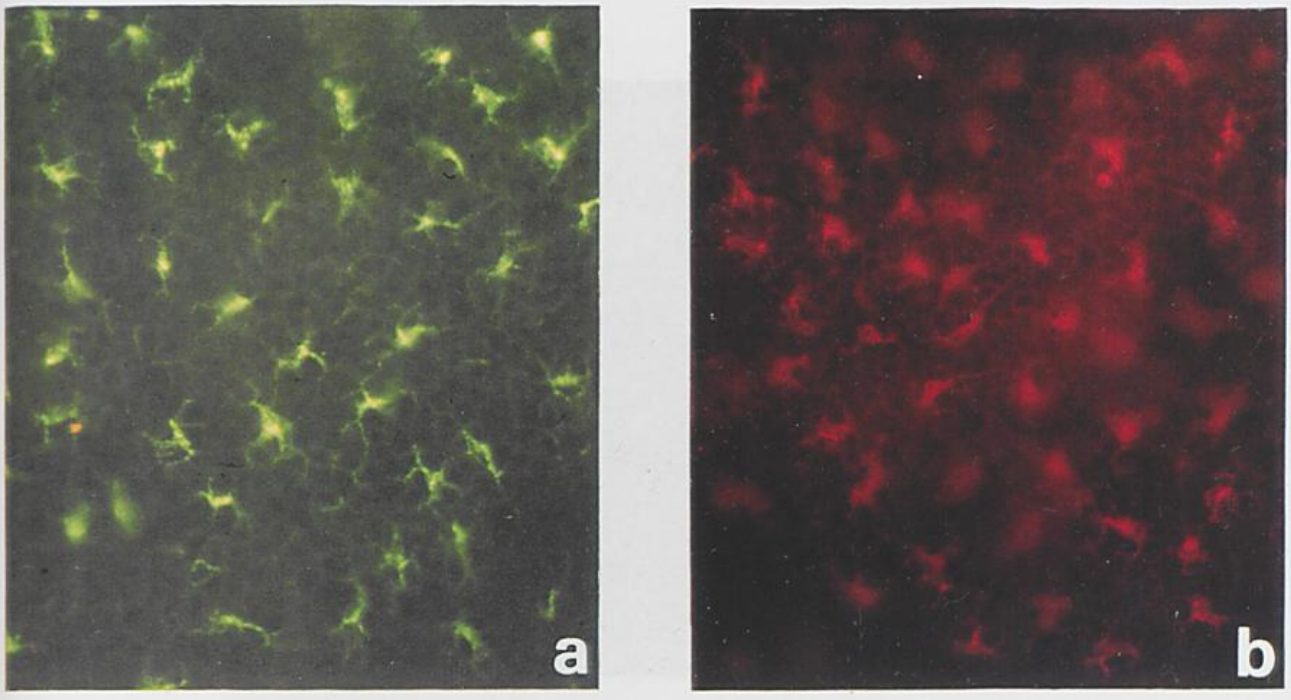


Abb.34: unkultivierte Epidermis, a: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50), b: Immunfluoreszenzfärbung gegen In-1 (unverdünnter supernatant); netzartige Verteilung der LC, deutliche In-1-Expression der LC sichtbar; 350-fache Vergrößerung.

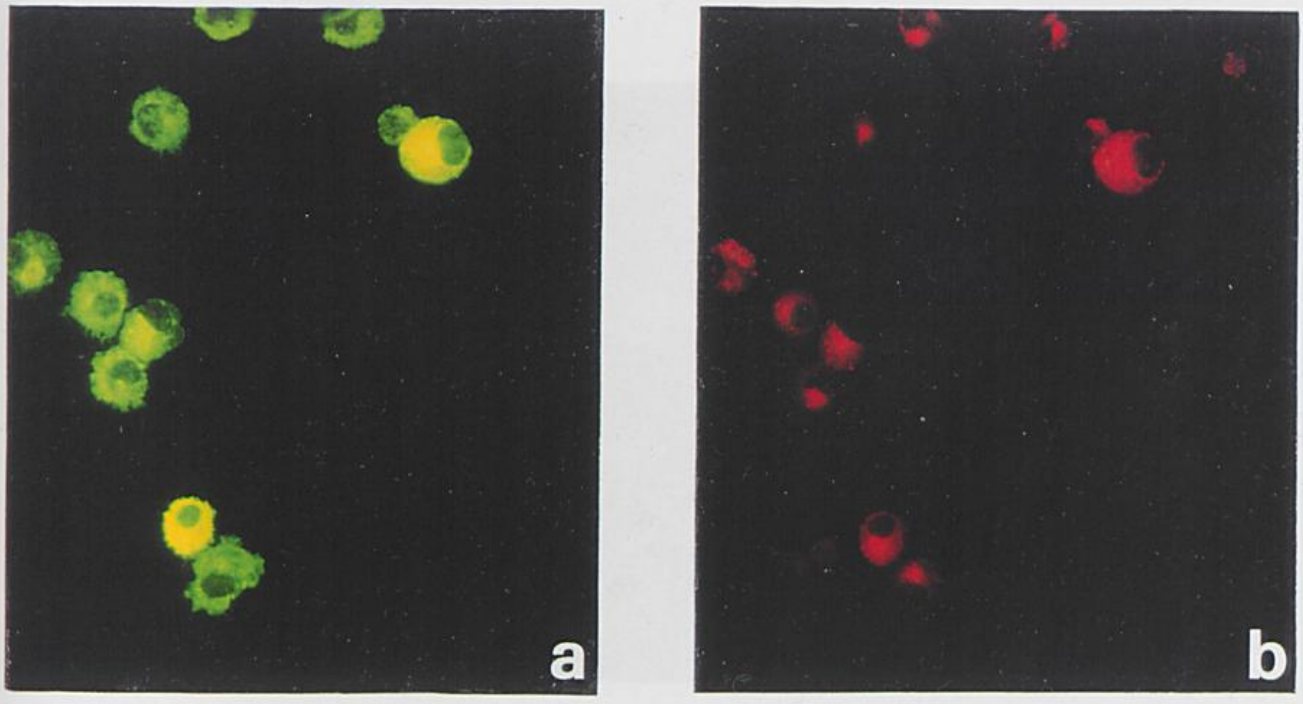


Abb. 35: 72 Stunden kultivierte EC-Suspension; a: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50), b: Immunfluoreszenzfärbung gegen 2A1 (unv. supernatant); die stark MHC-Klasse-II-positiven DC exprimieren viel 2A1; 350-fache Vergrößerung.

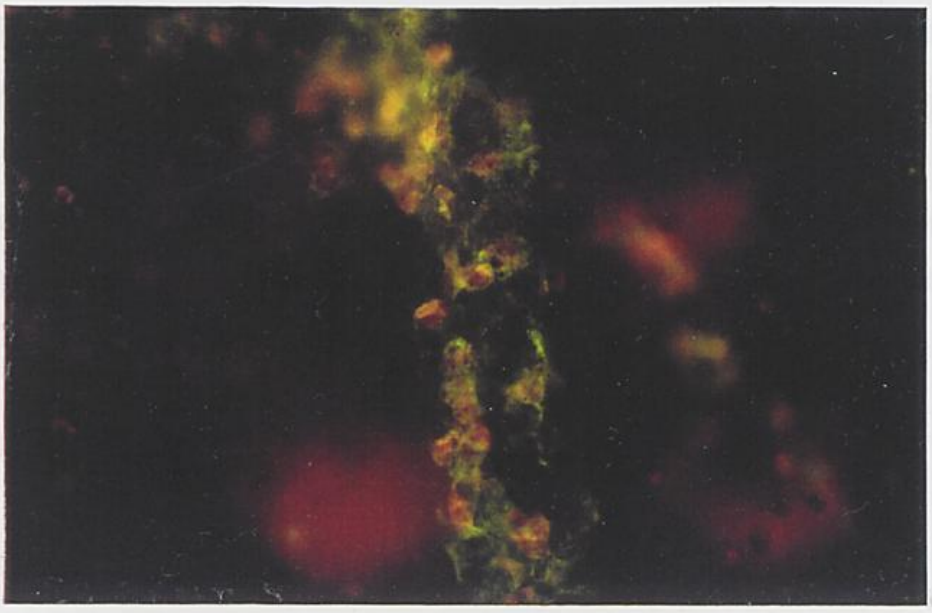


Abb. 36: 48 Stunden auf reinem R10-Medium kultivierte Dermis, Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50) und In-1 (unv. supernatant); in den cords sind emigrierende LC sichtbar, die noch teilweise In-1 exprimieren; 350-fache Vergrößerung.

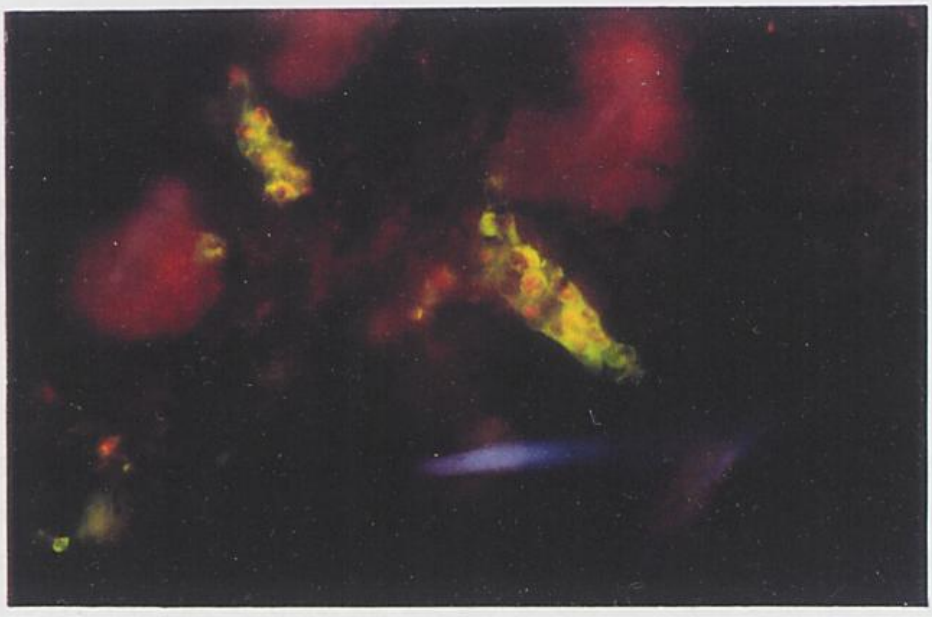


Abb. 37: 48 Stunden auf reinem R10-Medium kultivierte Dermis, Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50) und 2A1 (unv. supernatant); in den cords sind emigrierende LC sichtbar, die schon den Reifungsmarker 2A1 exprimieren; 350-fache Vergrößerung.

6 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie:

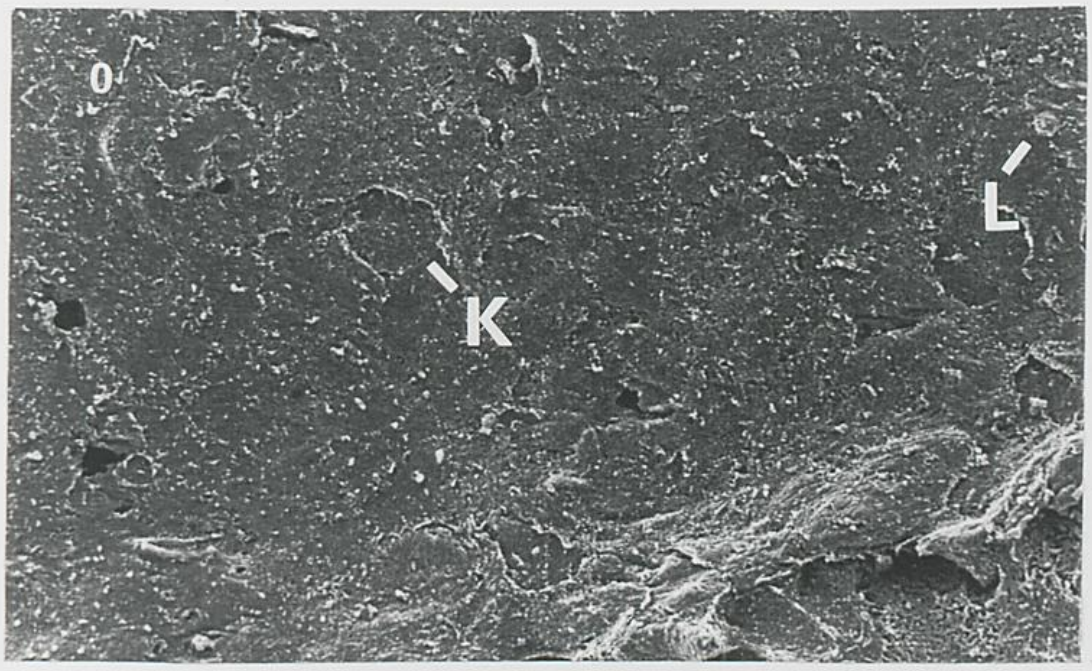
In Zusammenarbeit mit Univ.-Doz. Dr. K. Pfaller vom Institut für Histologie und Embryologie der Universität Innsbruck wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von kutanen dendritischen Zellen durchgeführt.

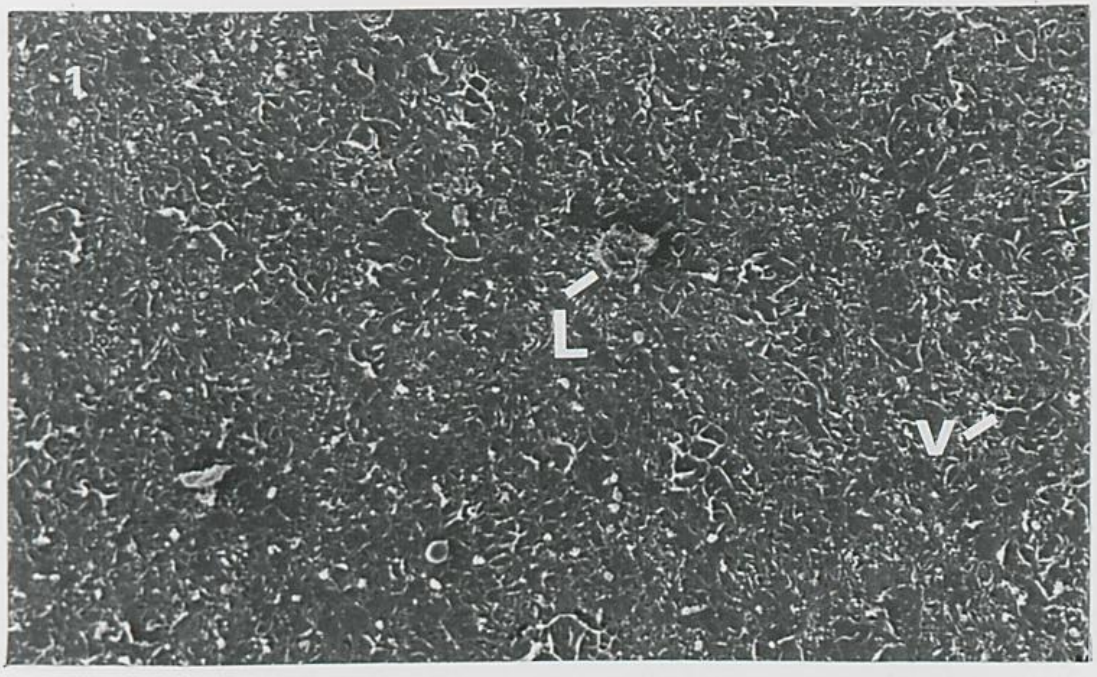
6.1 Untersuchung der Epidermis und Dermis:

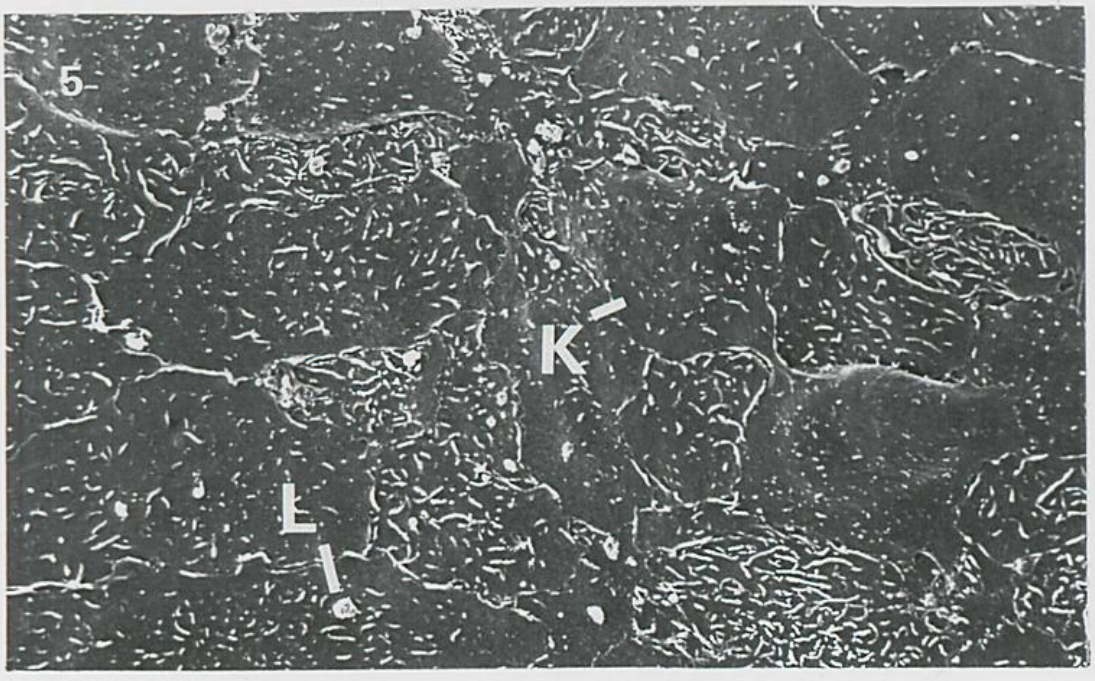
6.1.1 Kultur von Epidermis:

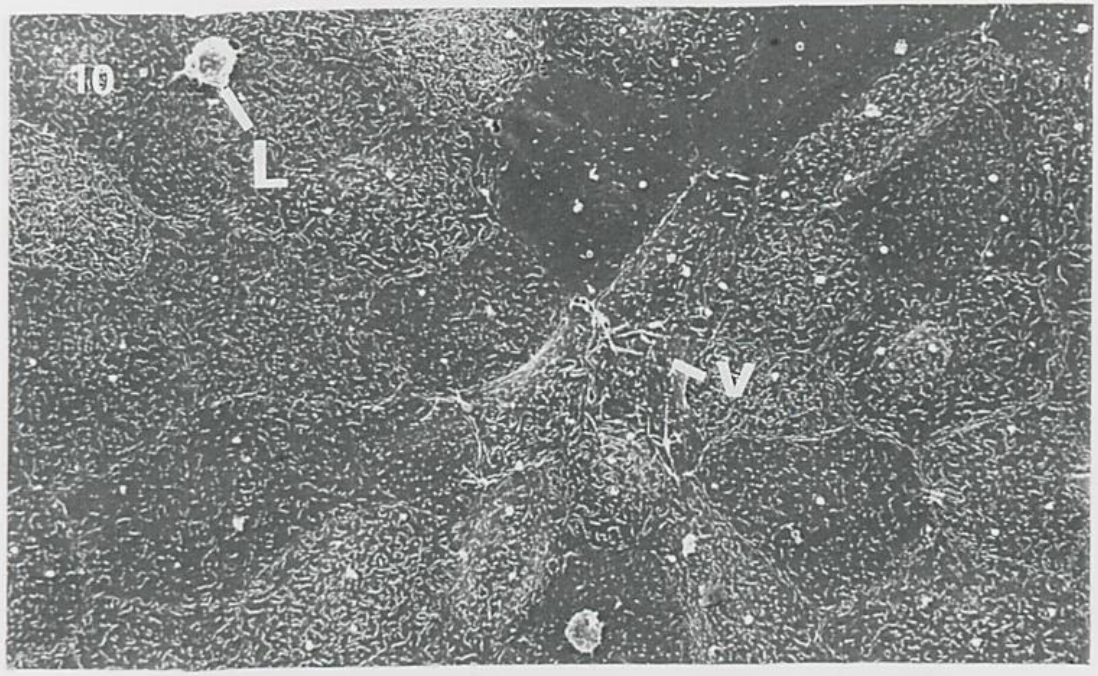
Um die Auswanderung der Langerhanszellen *in situ* zu beobachten, wurden kleine Epidermisstücke entweder frisch oder nach verschieden langer Kultivierung (0, 1, 5, 10 ,15, 20, 25, 30, 45 h) genommen, wie unter B 3.10.1 beschrieben fixiert und präpariert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von der zur Dermis gewandten Seite der Epidermis angefertigt, wo die Langerhanszellen aus der Epidermis kommend in die Dermis und dort wahrscheinlich in die Lymphbahnen einwandern. Das Ziel dieses Zeitverlaufes war es, auswandernde Langerhanszellen zu sehen, die Stellen der Emigration zu erkennen und Unterschiede in der Anzahl der Langerhanszellen im Laufe der Kultur festzustellen. Die Ergebnisse sind in den nächsten Fotos dargestellt (Abb. 38). Bei der gewählten Art der Trennung von Epidermis und Dermis (60) wird die kollagenöse *Lamina densa* von der Epidermis entfernt. Man blickt also direkt auf die basalen Keratinozyten.

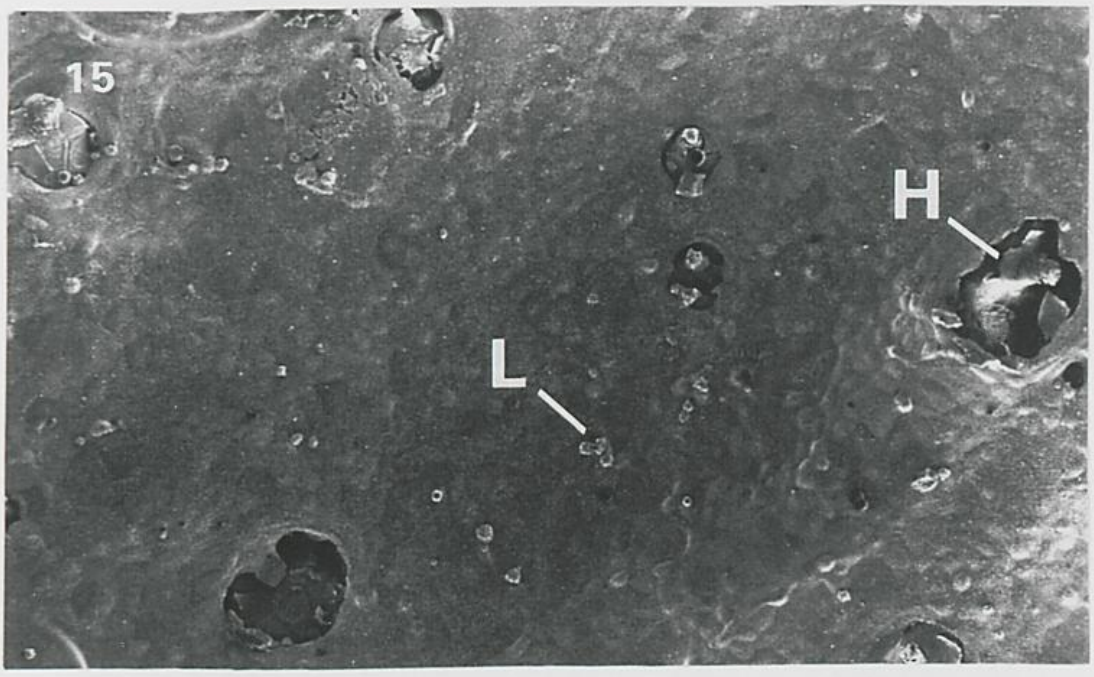
Abb. 38: (Seite 84ff.) Zeitverlauf einer 45-stündigen Kultur von Epidermis (0, 1 , 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 Stunden), dargestellt in den folgenden Fotos; die Zahl an emigrierenden Langerhanszellen nimmt im Verlauf der Kultur zu, der Epithelverband zerfällt nach 25h; H ... Haaröffnung, L ... Langerhanszelle, K ... Keratino-zyt, v ... villi; 0, 1, 10, 20, 25, 30, 45 Stunden-Fotos 2600-fache Vergrößerung; 5 Stunden 5200-fache Vergrößerung; 15 Stunden 390-fache Vergrößerung; LC ungefähr 10µm im Durchmesser.

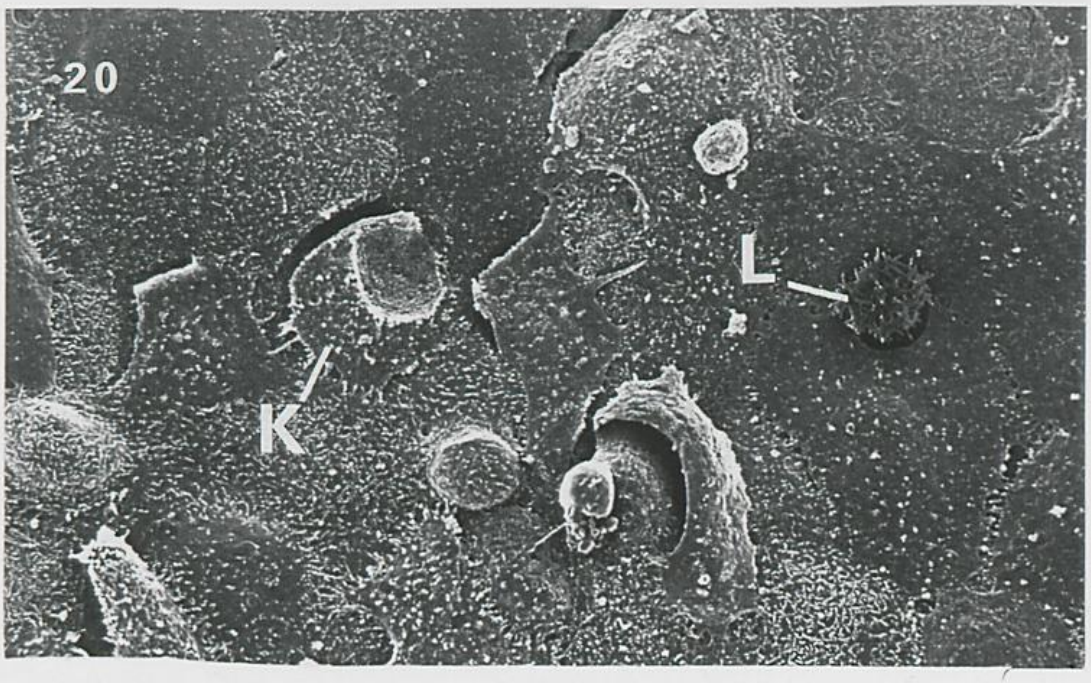

0
K
L

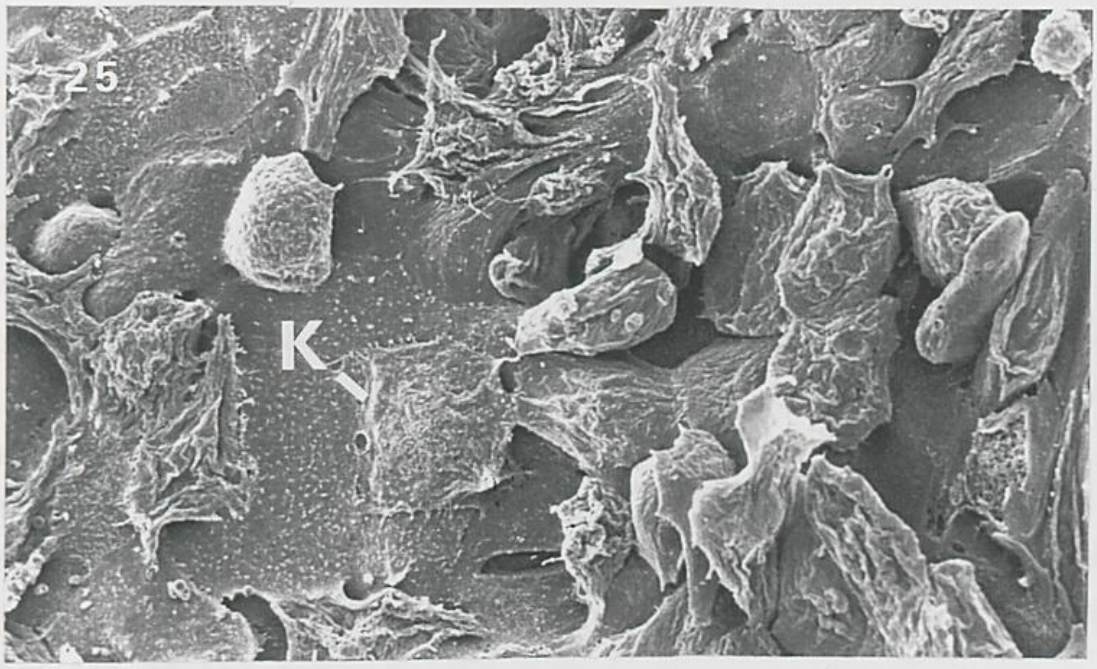

1
L
V


5
K
L

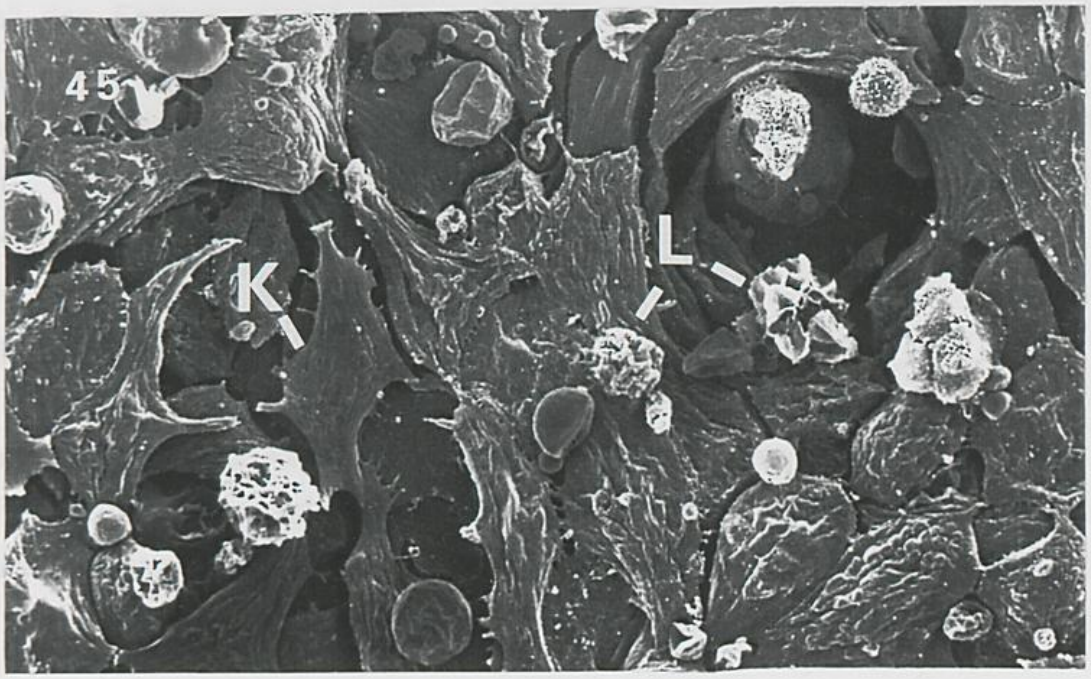

10
L
TV


15
H
L


20
L
K


25
K

K
L


45
K
L

Zum Zeitpunkt 0, der einer frisch präparierten Epidermis entspricht, war der deutlich strukturierte Aufbau des Epithels zu erkennen. Die Epithelzellen wiesen viele *villi* auf, mit denen sie sich *in situ* in der Basallamina und dem Bindegewebe der Dermis festhaken. Es waren keine emigrierenden Langerhanszellen eindeutig zu sehen, aber vermutlich zeigten sich erste Fortsätze dieser Zellen, die zwischen den Epithelzellen hervorragten (Abb. 38; 0).

Nach einstündiger Kultur der Epidermis auf reinem R10-Medium war das Erscheinungsbild des Epithels unverändert, jedoch waren schon erste wenige Langerhanszellen, die zwischen den Epithelzellen an Zellgrenzen auswanderten, sichtbar (Abb. 38; 1).

Bei den Kulturen über fünf und zehn Stunden entsprach das Bild der Epidermis dem der einstündigen Probe (Abb. 38; 5, 10).

Ab einer Kultivierung der Hautproben von 15 Stunden waren Langerhanszellen mit deutlichen *veils* erkennbar, jedoch stieg die Zahl der auswandernden Langerhanszellen erst nach einer 20-stündigen Kultur eindeutig an. Bis zu diesem Zeitpunkt waren auf der Epitheloberfläche *villi* zu sehen, die aber immer kürzer und seltener wurden (Abb. 38; 15, 20).

Auf der Epidermis, die 25 Stunden inkubiert worden war, konnte man erkennen, daß langsam ein Zerfall des Epithels begann und die *villi* völlig verschwunden waren. Die Zahl der Langerhanszellen mit schön ausgebildeten *veils* nahm beständig zu (Abb. 38; 25).

Die letzten zwei Proben (Abb. 38; 30, 45) zeigten einen immer stärker werdenden Zerfall des Epithels, sodaß richtige Spalten zwischen den Zellen entstanden, in denen die Langerhanszellen vermehrt hervorkamen. Die Oberfläche der Epithelzellen war vollkommen glatt, da keine *villi* mehr zu erkennen waren. Zusätzlich lösten sich bereits einige Keratinozyten von der Epidermis, weshalb die emigrierenden Langerhanszellen nicht mehr so deutlich zu identifizieren waren.

Zusammenfassung:

Anhand dieser Bilder kann man feststellen, daß durch Zerfall des Epithels nach bereits 25-stündiger Organkultur die Langerhanszellen möglicherweise eher passiv ins Medium gelangen. Daher sollte die 48-stündige Inkubationszeit bei der Kultur von Epidermis alleine nicht überschritten werden. Die Emigration der Langer-

hanszellen beginnt sehr bald nach Beginn der Organkultur, wobei diese Zellen bereits vor dem Tod der Maus zur Wanderung stimuliert worden sein könnten. Eine massive Auswanderung der Langerhanszellen war ab 15 bis 20 Stunden Kultivierung auf der Epidermisunterseite und im Medium erkennbar, und die Zahl der emigrierenden Langerhanszellen nahm im Verlauf der weiteren Organkultur beständig zu.

6.1.2 Kultur von Ohrhaut:

Zur Untersuchung der Emigration in kompletter Haut wurden Mäuseohren über 48 Stunden kultiviert und für die Rasterelektronenemikroskopie präpariert. Das entspricht dem System, das in den Auswanderungsstudien verwendet wurde. Die Betrachtung der Unterseite der Dermis sollte Aufschluß über die Wanderung der Langerhanszellen in der Dermis und über den Verlauf der *cords* geben.

Wie aus den nachfolgenden Fotos (Abb. 39-41) ersichtlich ist, waren zahlreiche emigrierende kutane dendritische Zellen zwischen den Fibrozyten und dem dichten Bindegewebsgeflecht sichtbar. Es war keine Konzentrierung der Zellen an bestimmten Stellen (Lymphbahnöffnungen) zu sehen, sondern eine relativ zufällige Verteilung. Das deutet auf eine Wanderung der kutanen dendritischen Zellen nicht nur in den Lymphbahnen, sondern auch diffus durch das Bindegewebe der Dermis hin.

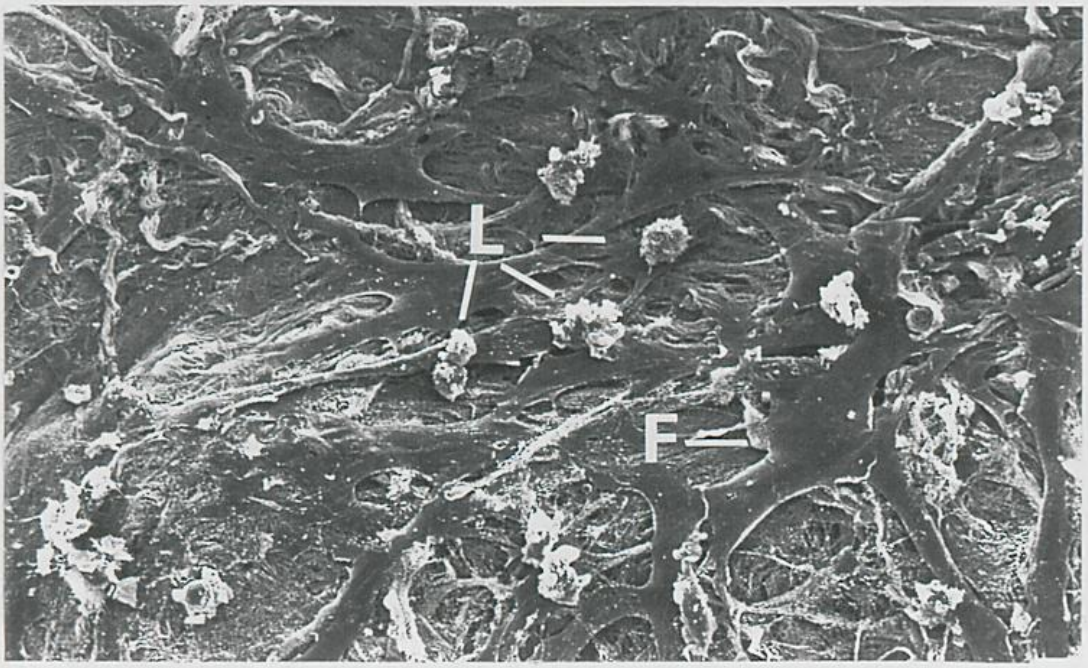


Abb.39: 48h-kultivierte Ohrhaut von der Unterseite der Dermis fotografiert; es sind emigrierende Langerhanszellen (L) zwischen den Fibrozyten (F) und dem Bindegewebsgeflecht (B) sichtbar; 1300–fache Vergrößerung.

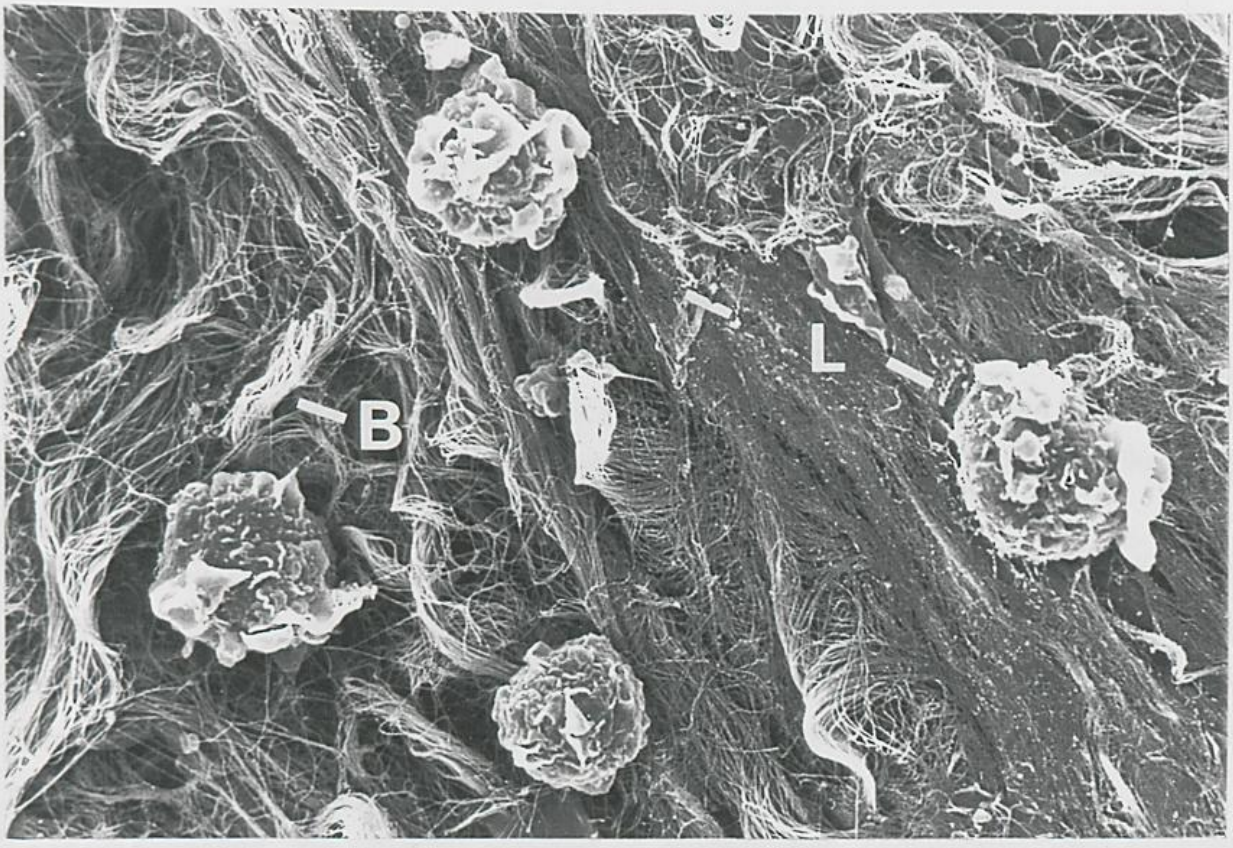


Abb. 40: 48h-kultivierte Ohrhaut von der Unterseite der Dermis fotografiert; es sind emigrierende Langerhanszellen (L) zwischen den Bindegewebsfasern (B) sichtbar; 5460–fache Vergrößerung.

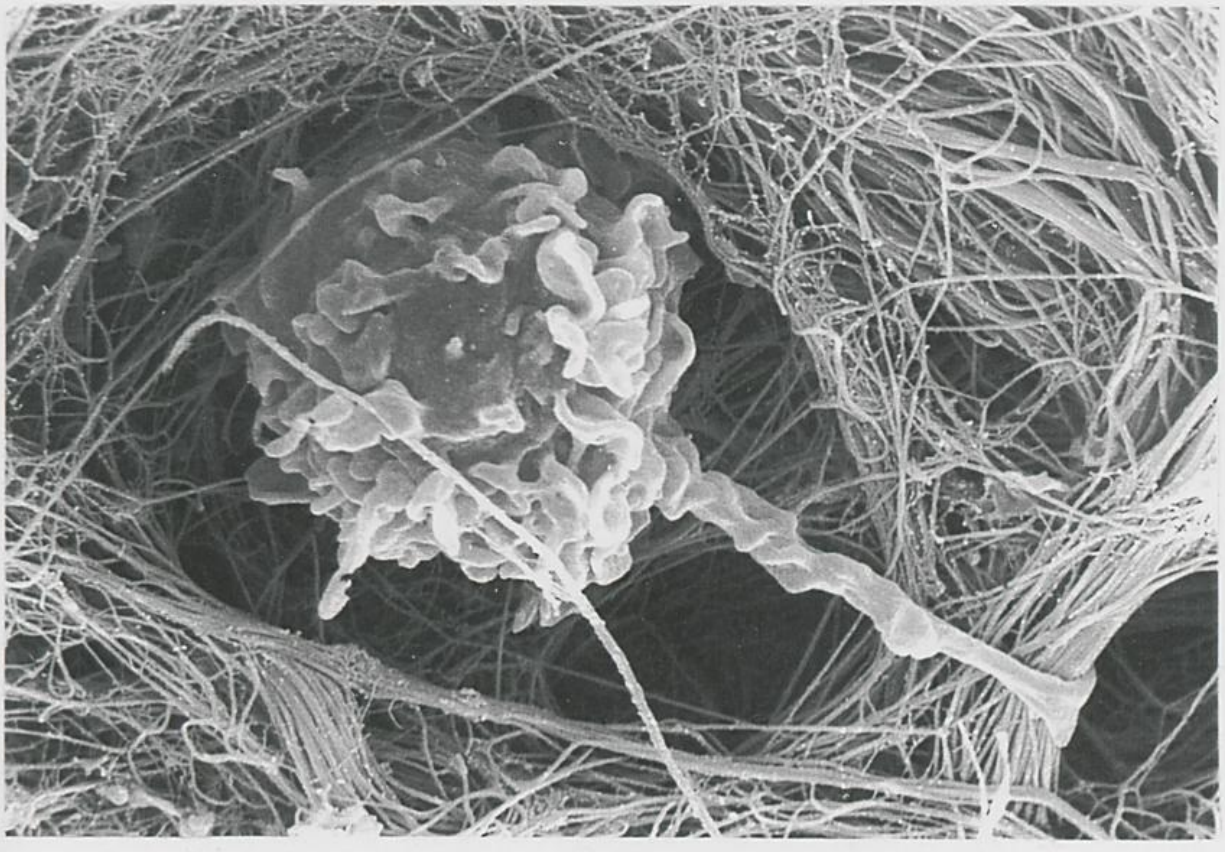


Abb. 41: Langerhanszelle, die sich mit den Ausläufern an Bindegewebsfasern aus der Dermis rauszieht; 24050 -fache Vergrößerung.

6.2 Untersuchung der aus der Epidermis und Dermis in 24 bzw. 48 Stunden emigrierten dendritischen Zellen und der in EC-Suspensionen gereiften Langerhanszellen:

Die kutanen dendritischen Zellen, die in 24 Stunden und in 48 Stunden aus der Epidermis und der Dermis auswandern, wurden getrennt im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Dabei zeigten sich kleine Unterschiede in der Ausbildung der Zytoplasmafortsätze bei den in 24 Stunden ausgewanderten Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen. Bei den in 48 Stunden emigrierten Zellen epidermalen und dermalen Ursprungs waren keine Unterschiede mehr zu sehen. Beide Zelltypen hatten deutliche *veils* ausgebildet (Abb. 42-45).

Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermalen Zellsuspensionen kultiviert worden waren, wurden mit den emigrierten Zellen aus der Epidermis verglichen. Es waren keine Unterschiede zwischen den *in situ* und *in vitro* gereiften Langerhanszellen zu erkennen (Abb. 46, 47).

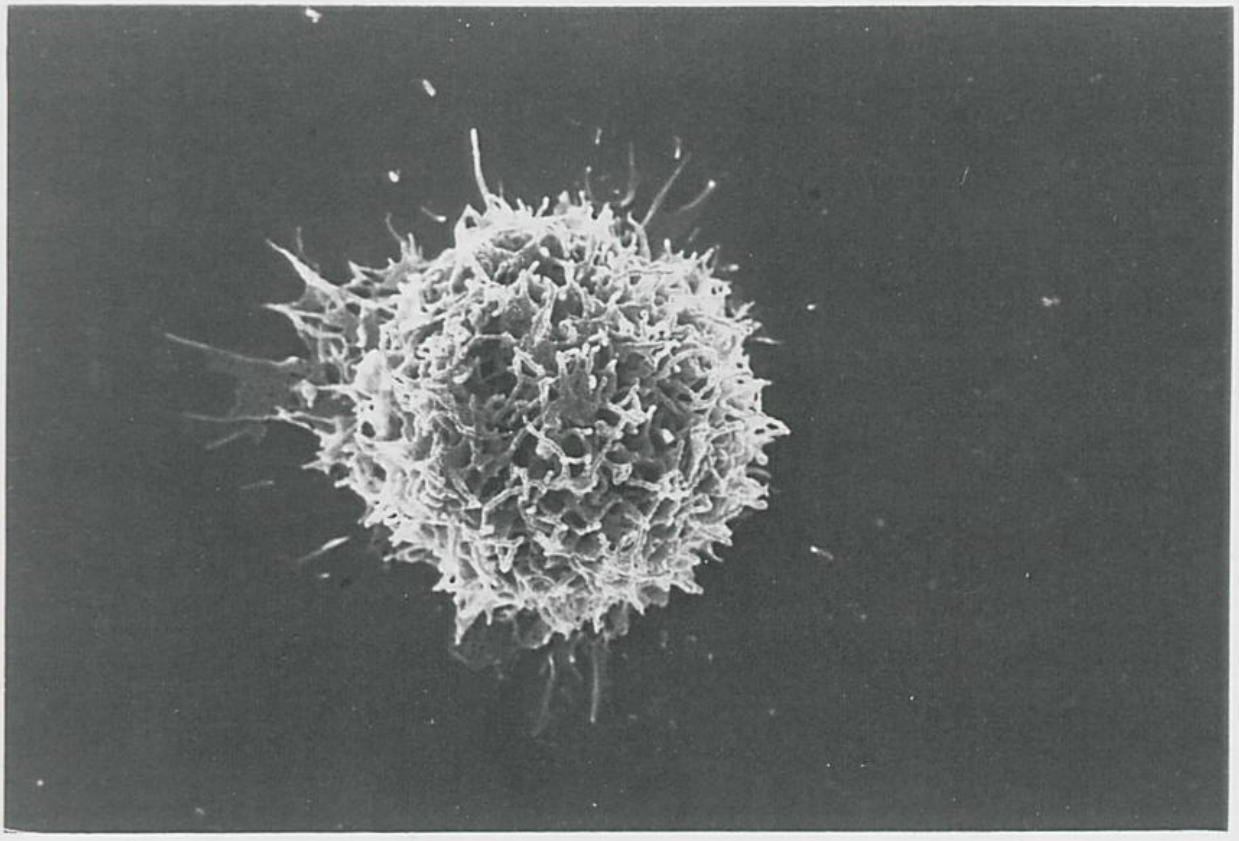


Abb. 42: Langerhanszelle mit Zytoplasmafortsätzen,aber noch nicht deutlich ausgeprägten *veils*, die in 24 Stunden aus der Epidermis ausgewandert ist; 13000-fache Vergrößerung.

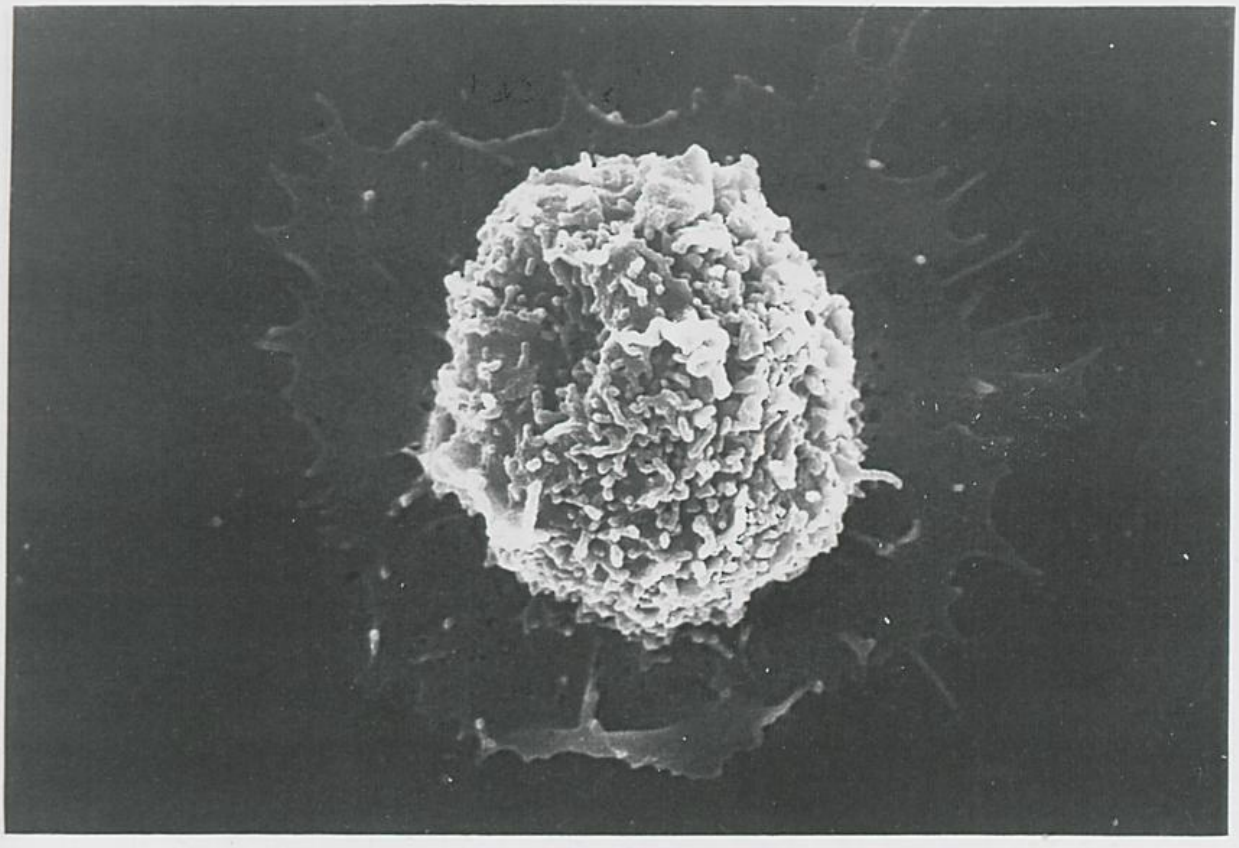


Abb. 43: Dermale dendritische Zelle mit Ansätzen von *veils*, die in 24 Stunden aus der Dermis ausgewandert ist und sich im Aussehen leicht von der Langerhanszelle unterscheidet; 20800-fache Vergrößerung.

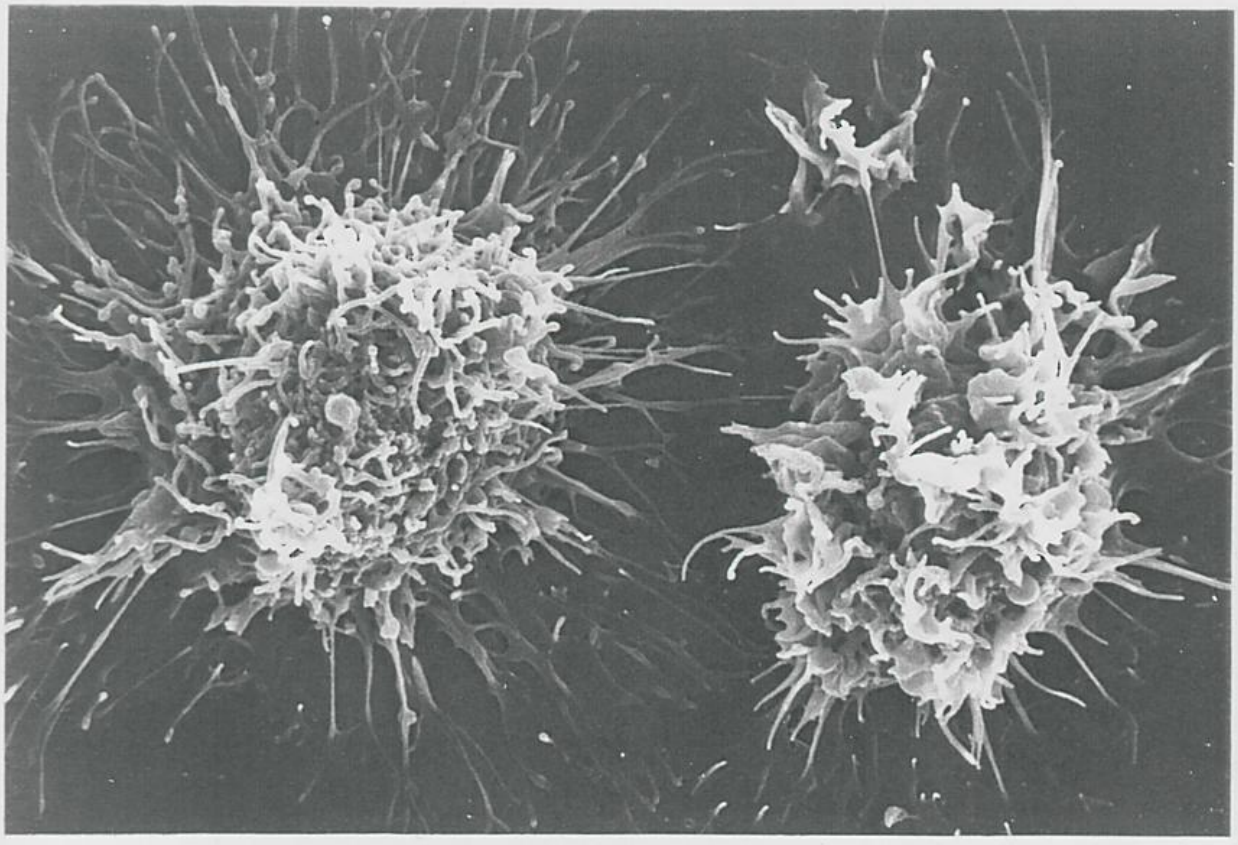


Abb. 44: Langerhanszellen mit deutlich sichtbaren *veils*, die in 48 Stunden aus der Epidermis ausgewandert sind; 12480-fache Vergrößerung.

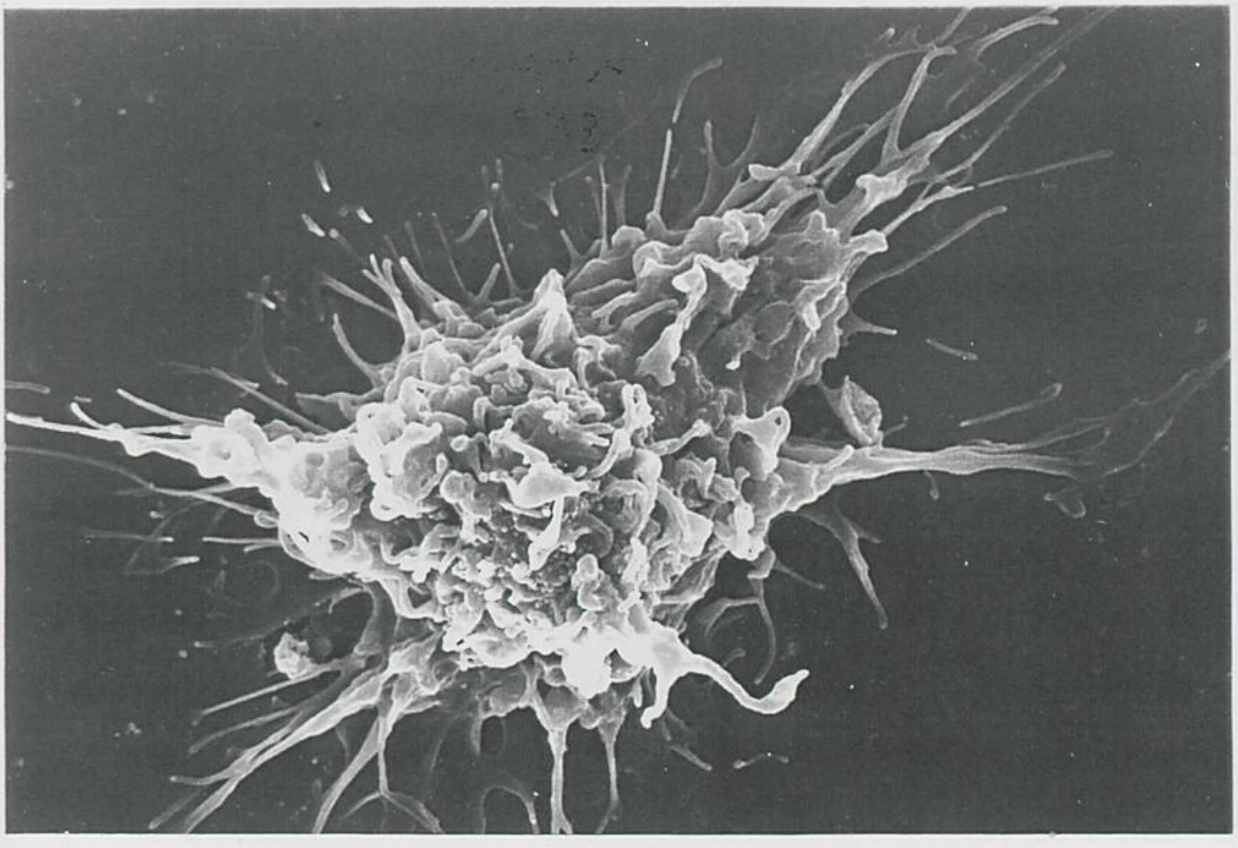


Abb. 45: Dermale dendritische Zelle mit deutlich ausgeprägten *veils*, die in 48 Stunden aus der Dermis ausgewandert ist und sich nicht mehr von der Langerhanszelle oben unterscheidet; 18200-fache Vergrößerung.

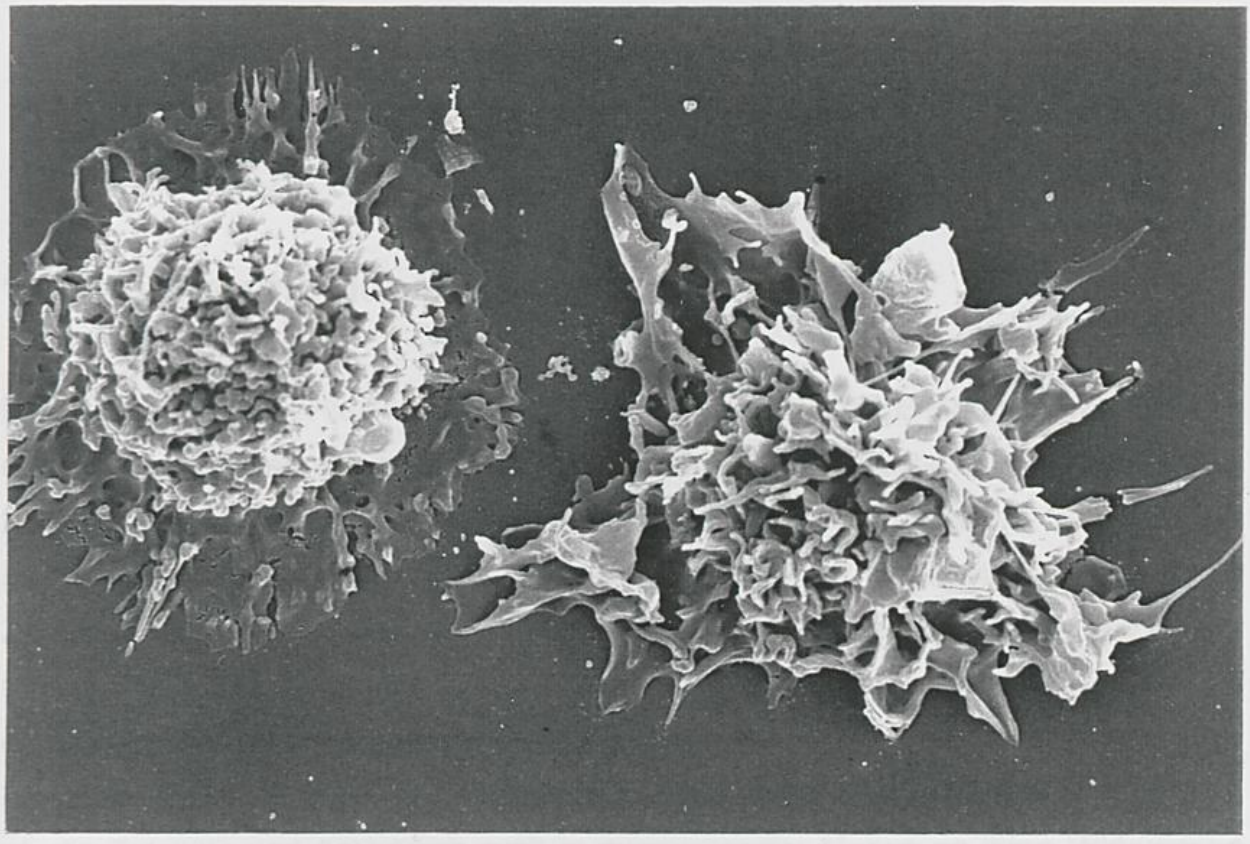


Abb. 46: Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermaler Zellsuspension kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht von *in situ* gereiften Langerhanszellen; 9720-fache Vergrößerung.

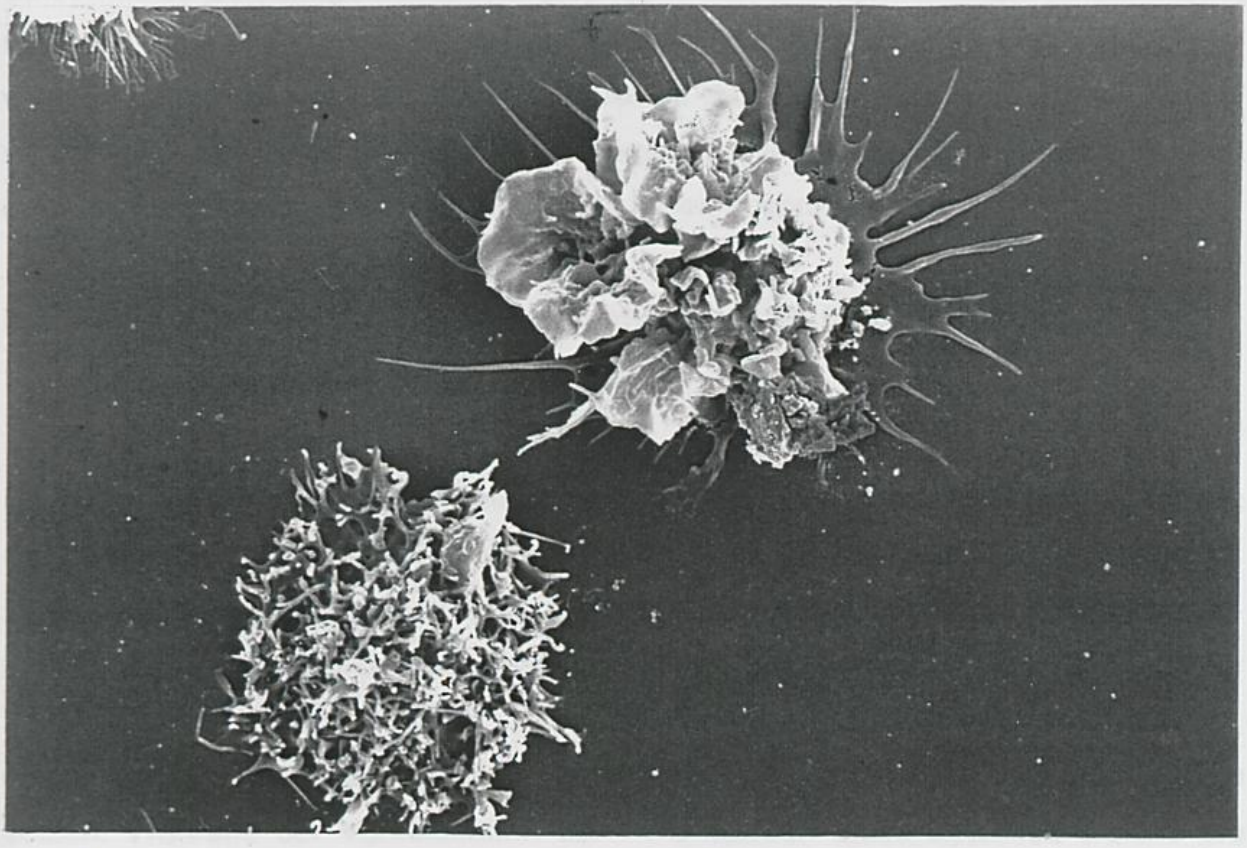


Abb. 47: Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermaler Zellsuspension kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht von *in situ* gereiften Langerhanszellen; 6480-fache Vergrößerung.

D. Diskussion

1 Optimierung der Organkultur:

Die Kultivierung von Haut ist eine elegante Methode, um die Emigration von kutanen dendritischen Zellen eingehend zu untersuchen. Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen diverser Zytokine und Antikörper in das Medium, auf dem die Hautstücke aufschwimmen, kann man deren Einfluß auf die Auswanderung durch Zählung der Zellen im Kulturüberstand bestimmen. Das System ist aber auch sehr fehleranfällig. Die Probleme, die bei dieser Methode auftreten, werden im Verlauf dieses Abschnittes noch weiter diskutiert (D 11).
Eines der Hauptprobleme, das sich gleich zu Beginn der Arbeit stellte, war die Frage, ob die Zytokine und Antikörper auch in ausreichender Menge an ihren Wirkungsort gelangen. Die Substanzen müssen im Laufe der Kultur durch die Dermis in die Epidermis zu den Langerhanszellen gelangen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. In früheren Experimenten an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie wurden Antikörper vor der Tötung der Mäuse lokal intradermal und intraperitoneal verabreicht. Um diese bewilligungspflichtigen Tierversuche zu vermeiden, wurden mehrere Modifikationen im Rahmen dieser Arbeit ausprobiert.

1.1 Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation der Mäuseohren bei +4°C:

Nach dem Abschneiden der Ohren werden diese zunächst im Kühlschrank auf einem mit PBS befeuchteten Tupfer in einer Petrischale für 26 bis 28 Stunden vorinkubiert. Diese Vorinkubation verhindert die spontane Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen, die durch das Abschneiden der Ohren bedingt ist. Allein dieser Vorgang kann, vermutlich durch vermehrte Freisetzung von endogenen Zytokinen, einen Stimulus zur Reifung und Wanderung von kutanen dendritischen Zellen setzen. Während der Vorinkubation bei +4°C werden diese Zytokine, welche die Versuchsergebnisse verfälschen würden, im Gewebe entweder abgebaut oder unwirksam. Nach Abschalten der endogenen Zytokinproduktion kann die Wirkung exogen zugegebener Zytokine und Antikörper besser untersucht werden (47, 48).

Um den Wirkungsgrad der exogenen Zytokine und Antikörper in der Organkultur zu verbessern und dadurch geringere Mengen an Reagenzien zu verbrauchen, wurden die Ohren in der Vorinkubationszeit auf R10-HEPES-Medium mit diversen Zytokin- und Antikörper-Konzentrationen aufgelegt. Die Idee war, daß die Substanzen bereits in dieser Zeit zu ihrem Wirkungsort diffundieren können, um in der nachfolgenden Kultivierung bei 37°C ihre Wirkung besser zu entfalten.
In den unter C 1.1 angeführten Experimenten zeigte sich, daß nach der Organkultur die Zahl der emigrierten kutanen dendritischen Zellen gegenüber der herkömmlichen Methode stark verringert war und die Zellen ein deformiertes Aussehen besaßen. Auch ein Wechsel vom R10-HEPES-Medium nach der Vorinkubation zu R10-Medium für die Inkubation im Brutschrank brachte keine deutliche Verbesserung. Die Zellzahlen waren etwas höher als beim ersten Versuchsansatz, aber die dendritischen Zellen zeigten wiederum eine untypische Form und hatten kaum ausgebildete *veils*. Die erwartete Erhöhung der Wanderungsrate durch Zugabe von TNFα 50 U/ml und die Verringerung derselben durch Antikörper-Zugabe war nur teilweise beobachtbar. Dies läßt auf eine ungenügende Wirkung der Kulturzusätze in diesem modifizierten System schließen. Aus der Deformation bzw. dem Fehlen der *veils* kann man auf einen negativen Effekt der Bestandteile von R10-HEPES auf die Reifung und Wanderung der kutanen dendritischen Zellen schließen. Eine Vorinkubation der Ohren auf R10-Medium war wegen der Instabilität des pH-Wertes nicht durchführbar. Wenn eine nicht toxische Abpufferung des pH-Wertes in diesem Medium während der Vorinkubation gelänge, wäre es interessant, weitere Versuche durchzuführen.

1.2 Vorinkubation der Ohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium:

Eine weitere Modifikation des Systems zur Verbesserung der Zytokin- und Antikörperwirkung basiert auf einer Arbeit von Rambukkana (61). Dabei wurde explantierte humane Haut mit der epidermalen Seite nach unten auf Medium mit Zytokin- und Antikörper-Zusätzen inkubiert, damit diese zwischen den verhornten Epithelzellen besser in das Gewebe eindringen können.
In dem in dieser Arbeit angeführten Experiment (C 1.2) wurden die Mäuseohren eine Stunde mit der epidermalen Seite nach unten auf Medium mit diversen Zusätzen inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Hautstücke umgedreht und für weitere

47 Stunden mit der dermalen Seite nach unten im Brutschrank inkubiert.
Die anschließende Zählung zeigte wieder eine starke Verminderung der Zellzahl. Die ausgewanderten dendritischen Zellen zeigten im Gegensatz zur ersten Modifikation deutliche *veils*. Zusätzlich war bei den verkehrt inkubierten Ansätzen eine Wirkung von TNFα 50 U/ml und anti-TNFα zu erkennen. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen von Rambukkana (61), der nach Inkubation der Haut auf IL-1β eine Wanderung der Langerhanszellen zur epidermal-dermalen Junktionszone beobachten konnte. Eine Vorinkubation mit anti-IL-1β konnte eine Kontaktallergen-induzierte Langerhanszellwanderung verhindern.
Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an emigrierten kutanen dendritischen Zellen wäre, daß die Langerhanszellen durch die einstündige Inkubation mit der epidermalen Seite nach unten und durch die umgekehrte Einwirkungsrichtung der Reagenzien ihre Wanderungsrichtung verändert haben und im Gewebe „steckengeblieben" sind. Weiters wäre möglich, daß die während der einstündigen Inkubation in die Luft ragende Dermis ausgetrocknet ist, und die Zellen deshalb nicht mehr durch sie hindurch auswandern konnten.
Diese Modifkation des Organkulturmodelles zeigte einen deutlichen Einfluß der Zytokine und Antikörper. Da sich aber der Wirkungsgrad nicht wesentlich vom bereits von Ortner und Zanella etablierten System (47, 48) unterschied (Vorinkubation auf PBS-feuchtem Tupfer bei +4°C) und zudem die Zellzahlen zu niedrig waren, wurde auch diese Versuchsanordnung in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet.

2 Exogenes TNFα kann in der Organkultur die Migration von kutanen dendritischen Zellen wesentlich beeinflussen:

2.1 Die Wirkung von TNFα ist dosisabhängig:

Die Ergebnisse der Experimente von Ortner, Zanella, Koch und Janke (47, 48) konnten im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Versuchen (C 2.1) bestätigt werden. In einer TNFα-Reihe mit steigender TNFα-Konzentration wurde die Dosisabhängigkeit der Wirkung dieses Zytokins untersucht. In einer Konzentration von 50 U/ml kann TNFα die Emigration von kutanen dendritischen Zellen verstärken. Die Wanderungsrate war durchschnittlich um 26% erhöht, in einzelnen Experimenten gab es sogar Steigerungen um bis zu 99%. Bereits ab einer TNFα-Konzentration von 75 U/ml sank die Zahl der ausgewanderten Zellen auf das Niveau der Kontrolle (R10-Medium ohne Zusätze). Eine Hemmung der Migration war ab 200 U/ml TNFα zu erkennen. Durch Steigerung der Konzentration auf 5000 U/ml konnte die Wanderungsrate um durchschnittliche 48% verringert werden, wobei in Einzelexperimenten eine Hemmung von bis zu 90% auftrat. Die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen kamen durch die bereits angesprochenen Probleme und die Fehleranfälligkeit des Systems zustande (D 11).
Aus diesen Daten kann man auf unterschiedliche Effekte von TNFα, abhängig von der eingesetzten Dosis, schließen. In geringer Dosis (50 U/ml) kann dieses Zytokin die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis verstärken. Dieser Zunahme der dendritischen Zellen im Medium nach 48-stündiger Organkultur steht eine Abnahme der Zelldichte in der Epidermis gegenüber, die durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit MHC-Klasse II sichtbar gemacht werden konnte (C 2.1.4, Abb. 18). In der Dermis waren deutlich ausgeprägte *cords* mit MHC-Klasse-II-positiven Zellen zu sehen (C 2.1.4, Abb. 19).
Die Arbeitsgruppe um Cumberbatch und Kimber machte in ihren Versuchen ähnliche Beobachtungen (23, 34). Nach einer intradermalen Injektion von murinem rekombinanten TNFα war eine zeit- und dosisabhängige Zunahme der dendritischen Zelldichte in den Lymphknoten beobachtbar. Gleichzeitig war eine Abnahme der Zahl an Langerhanszellen in der Epidermis erkennbar. Die maximale Auswanderung von

Langerhanszellen konnte in diesen Versuchen ab einer Konzentration von 50 ng gezeigt werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden 4 ng (= 50 U/ml) als optimale Dosis bestimmt, was aber auf die unterschiedliche Versuchsdurchführung zurückzuführen sein dürfte. Die im Gewebe vorherrschenden Konzentrationen, die *in vivo* zur Emigration der LC führen, sind noch nicht bekannt.
Dieselben Ergebnisse erhielten Senoo et al. nach intradermaler Injektion von murinem rekombinanten TNFα (64). In diesen Versuchen war eine Abnahme der epidermalen NLDC-145-positiven Zellen in der Haut zu beobachten. Gleichzeitig war eine Zunahme der NLDC-145-positiven Zellen in den Lymphknoten sichtbar, was auf eine gerichtete Wanderung der Zellen in lymphatisches Gewebe hindeutet. Roake und Austyn konnten bei systemischer Verabreichung von rekombinantem humanen TNFα eine verringerte Langerhanszellzahl in der Epidermis von Mäusen und die Ausbildung von *cords* in der Dermis feststellen (50). Groves et al. konnten bei freiwilligen Versuchspersonen durch intradermale Injektion von einmal 100 U/ml bzw. 5000 U/ml oder fünfmal 100 U/ml rekombinantem humanen TNFα eine Abnahme der Langerhanszelldichte in der Epidermis und eine Zunahme der Zahl an dermalen dendritischen Zellen nachweisen, was auf eine Rekrutierung von Vorläufern in die Haut hindeutet (65). Zusätzlich konnte die Bildung von inflammatorischen Zell-infiltraten und eine Hochregulierung von diversen Adhäsionsmolekülen in der Haut beobachtet werden.
In den unter C 4.1 angeführten Elisas konnte TNFα nur bei Zugabe in die Organkultur nachgewiesen werden, aber in geringeren Mengen. In den Überständen der Kultur auf reinem R10-Medium ohne Zytokin-Zusätze war die Menge an TNFα immer unter der Nachweisgrenze. Auch bei Zusatz von IL-1β und GM-CSF zum Medium war keine Zunahme an TNFα zu beobachten. Das läßt auf Probleme beim Nachweis des in der Kultur vorhandenen TNFα schließen, da eine Induktion und das Vorkommen von TNFα bei der Emigration von kutanen dendritischen Zellen bewiesen ist (66). Andererseits wäre ein hoher Verbrauch an TNFα während der Organkultur eine mögliche Erklärung dafür, daß dieses Zytokin nicht detektierbar war.

2.2 Die Migrationshemmung bei hohen Dosen TNFα ist nicht auf die Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen:

Die Migrationshemmung durch hohe Dosis TNFα wurde bisher mit der vermuteten Toxizität dieses inflammatorischen Zytokins erklärt. Aus den Experimenten unter C 2.1.1 und C 2.1.2 ist ersichtlich, daß TNFα in hoher Dosis (5000 U/ml) zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl emigrierender Langerhanszellen führte. Im Gegensatz dazu war nach MHC-Klasse-II-Färbungen von epidermalen *sheets* zwischen auf TNFα 5000 U/ml und R10 kultivierter Ohrhaut kein Unterschied in der Zelldichte erkennbar (C 2.1.4, Abb. 16, 20). Für diese Diskrepanz zwischen der Langerhanszelldichte in der Epidermis und der Zahl der emigrierten Zellen gibt es zwei Erklärungen. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Langerhanszelldichte in der Haut in dem Ausmaß nicht zu erkennen bzw. nur durch Zählung der verbleibenden Langerhanszellen in der Epidermis bestimmbar. Eine andere Erklärung für die reduzierte Zellzahl im Medium wäre, daß die Langerhanszellen aus der Epidermis auswandern, aber auf ihrer Wanderung in der Dermis in den Lymphbahnen „steckenbleiben". Diese Theorie wurde durch Färbungen der Dermis mit MHC-Klasse II weiter untersucht. In Abb. 21 unter C 2.1.4 kann man im Gegensatz zum Bild der frisch präparierten Haut (C 2.1.4, Abb. 15) und der auf reinem R10-Medium kultivierten Haut (C 2.1.4, Abb. 17) stark vergrößerte und mit Langerhanszellen angefüllte *cords* beobachten, was für eine Inhibierung der Langerhanszellwanderung in der Dermis durch die hohe Dosis TNFα sprechen würde. Diese Hemmung der Wanderung wird durch die Ergebnisse von Groves et al. (65) unterstrichen, die bei intradermaler Injektion von 5000 U/ml rekombinantem humanen TNFα ebenfalls eine Abnahme der Langerhanszellzahl ähnlich wie bei 100 U/ml TNFα erkennen konnten. Die gleichen Daten erhielten Cumberbatch und Kimber (23), die bei Injektion von 50 ng rekombinantem murinen TNFα die maximale Reduktion der Langerhanszelldichte feststellen konnten.

Zur Untersuchung der Toxizität der hohen Dosis TNFα wurden Versuche durchgeführt, in denen die Ohrhaut teilweise über 96 Stunden auf TNFα 5000 U/ml kultiviert wurde. Bei der Zählung und Beobachtung der Zellen im Medium wurde eine unveränderte Zellviabilität festgestellt, wobei berücksichtigt werden muß, daß die toten Zellen während dieser langen Kulturzeit möglicherweise zerfallen und somit nicht mehr unter dem Mikroskop zu sehen waren. Die Wanderungsrate der kutanen

dendritischen Zellen stieg bei der Organkultur bis 96 Stunden stark an (44% bis 162%), was aber durch Zerfall des Epithelverbandes erklärbar ist. Die Auflösung der Epidermis war in immunhistochemischen Färbungen mit Peroxidase deutlich zu erkennen. Um die Zellviabilität der ausgewanderten Zellen zu untersuchen, wurde ein funktioneller Test (oxidative Mitogenese, (59)) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß dendritische Zellen aus den TNFα 5000 U/ml-Kulturen im Vergleich zur Kontrolle (R10-Medium ohne Zusätze) T-Lymphozyten gleich gut stimulieren konnten.
Durch diese Experimente kann eine Hemmung der Migration kutaner dendritischer Zellen durch eine mögliche Toxizität von TNFα in hoher Dosis ausgeschlossen werden. Vielmehr zeigte sich, daß dieser Effekt sehr wahrscheinlich auf eine Inhibierung der Wanderung in der Dermis zurückzuführen ist. Möglicherweise spielt das Gerinnungssystem, das von TNFα beeinflußt werden kann, eine Rolle.

2.3 Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern kann die migrationsfördernde Wirkung von TNFα aufgehoben werden:

Um die Rolle, die TNFα in der Organkultur bei der Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen spielt, genauer zu untersuchen, wurden mehrere Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNFα durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der eine war ein käuflicher, gereinigter polyklonaler Antikörper von Biosource, der andere ein nicht gereinigter Antikörper aus einem Kulturüberstand (V1q) von Dr. Echtenacher aus Regensburg (54).
Beide Antikörper führten bereits im reinen R10-Medium zu einer leichten Verringerung der Anzahl emigrierter Zellen. Diese Hemmung der Migration ist wahrscheinlich auf *in situ* vorhandenes TNFα zurückzuführen, das während der 48-stündigen Organkultur von Keratinozyten gebildet wird und die Langerhanszellen zur Wanderung stimulieren kann. Durch Neutralisierung dieses endogenen TNFα konnte die Wanderungsrate in der Kontrolle um bis zu 30% verringert werden. Die gleichen Ergebnisse erhielt Zanella in ihren Experimenten (48), in denen sie anti-TNFα (V1q) intraperitoneal injizierte und zusätzlich während der Organkultur ins Medium gab. In mehreren Versuchen war eine Hemmung der Migrationsrate um bis zu 70% zu erkennen.
Weiters konnte, wie unter C 2.1.3 angeführt, durch Zugabe von beiden Antikörpern in

die Organkultur die migrationsfördende Wirkung von TNFα 50 U/ml vollständig aufgehoben werden. Bei hoher Dosis TNFα konnten die Antiköper die Migrationshemmung nicht mehr beeinflussen, da sie nicht in ausreichend neutralisierenden Mengen zugegeben worden waren.
Die Arbeitsgruppe von Austyn konnte ebenfalls zeigen, daß durch vorherige Verabreichung von anti-TNFα eine durch LPS induzierte Reduktion der Langerhanszellzahl verhindert werden konnte (50). Cumberbatch und Kimber beobachteten nach systemischer Verabreichung von anti-TNFα eine starke Inhibierung der allergeninduzierten Wanderung der dendritischen Zellen in die Lymphknoten (66). Piguet et al. beobachteten eine verminderte Reaktion sowohl auf Irritantien als auch auf Kontaktallergene durch Vorbehandlung mit anti-TNFα (67).

All diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von TNFα bei der Immunantwort auf bakterielle Infektionen und bei Kontakthypersensibilisierungsreaktionen hin, da sowohl in der Organkultur, als auch in den oben erwähnten Experimenten anti-TNFα die Wirkung von TNFα aufheben konnte. TNFα scheint somit einer der wichtigsten Mediatoren bei der Induktion der Emigration von Langerhanszellen zu sein.

3 Exogenes IL-1 führt in der Organkultur zu einer Migrationssteigerung:

3.1 IL-1 kann erst in hoher Dosis die Migration von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen:

In den von Koch und Janke durchgeführten Vorversuchen war in der IL-1α- und der IL-1β-Reihe erst ab einer Konzentration von 2000 U/ml eine Migrationssteigerung erkennbar (C 2.2.1). Auf dieser Basis wurde in zehn weiteren Versuchen die Wirkung von hoher Dosis IL-1β (2800 bzw. 3000 U/ml) in der Organkultur untersucht.
Trotz schwankender Werte war eine Erhöhung der Wanderungsrate bei hoher Dosis IL-1β ersichtlich (C 2.2.2). Die durchschnittliche Steigerung lag bei 30% (2800 U/ml) bzw. 21% (3000 U/ml), wobei die Wanderungsrate in einem Experiment sogar um 78% erhöht werden konnte. Im Gegensatz zu TNFα kann exogenes IL-1β erst in hoher Dosis die Wanderung von Langerhanszellen beeinflussen.

Die Notwendigkeit von so großen Mengen IL-1β (280 bis 300 ng/ml) könnte auf einen höheren Bedarf an IL-1β als an TNFα für die Stimulation der Emigration von Langerhanszellen hindeuten. Eine andere Erklärung wäre, daß dieser Induktor der Migration schlechter zum Wirkungsort diffundieren kann, oder daß das rekombinante Zytokin eine geringere Wirksamkeit aufweist.

In Versuchen von Enk und Katz konnte gezeigt werden, daß nach einer intradermalen Injektion von 25 bis 50 ng murinem rekombinanten IL-1β eine Reduktion der Langerhanszellzahl in der Epidermis auftrat (36). Der hierbei niedrigere Bedarf an Zytokin ist durch die unterschiedliche Administration zu erklären und deutet auf eine schlechtere Diffusion oder Wirksamkeit des rekombinanten Zytokins in der Organkultur hin.

Die Arbeitsgruppe von Nylander-Lundqvist konnte ebenfalls eine Abnahme der Langerhanszelldichte nach intrakutaner Injektion von rekombinantem IL-1β feststellen, die 24 Stunden nach der Injektion einsetzte und nach 48 Stunden den Höhepunkt erreichte (68). Bei beiden Untersuchungen waren vergrößerte und stärker MHC-Klasse-II-positive Zellen in der Epidermis zu sehen.

Bei der Messung der IL-1β-Konzentration in den Kulturüberständen mit Elisa ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse (C 4.2). Die ermittelten Werte schwankten, wobei IL-1β in den Überständen der R10-Kontrolle und bei Zugabe von TNFα in die Kultur nachweisbar war. Bei der Zugabe von hoher Dosis IL-1β waren annähernd die eingesetzten Mengen meßbar.

Bei der Zugabe von hoher Dosis IL-1α konnte ebenfalls eine Migrationssteigerung beobachtet werden. Daraus kann man schließen, daß dieses von Keratinozyten produzierte Zytokin bei der Induktion der Emigration von Langerhanszellen ebenfalls eine Rolle spielt. Es ist bekannt, daß IL-1α in hoher Dosis denselben Effekt wie IL-1β hat (36) und beide Zytokine an denselben Rezeptor binden. Weiters könnte die Wirkung von IL-1α durch eine Induktion von verschiedenen Zytokinen, wie IL-1β, TNFα, GM-CSF etc. bedingt sein.

3.2 Neutralisierende Antikörper gegen IL-1 können die Migration von kutanen dendritischen Zellen hemmen:

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von IL-1 bei der Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen aus der Haut wurden verschiedene Antikörper gegen IL-1α und IL-1β in der Organkultur verwendet.

Die Ergebnisse waren schwankend, jedoch kam es mehrheitlich zu einer Hemmung der Migration (C 2.2.3). Die Zugabe von anti-IL-1β zu reinem R10-Medium führte meistens zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Dies deutet wie bei TNFα auf ein *in situ* Vorkommen von IL-1β hin, das von Langerhanszellen in der Epidermis produziert wird. Durch Neutralisation des endogenen IL-1β sinkt die Zellzahl der emigrierenden Zellen in der Organkultur. In ihrer Arbeit konnte Ortner (47) ähnliche Beobachtungen machen. Nach intradermaler Injektion von 30 ng IL-1β konnte sie eine Migrationssteigerung um 40% erkennen, bei Applikation von 20 µl anti-IL-1β kam es zu einer Hemmung der Auswanderung um ca. 40%.

In den jetzigen, hier unter C 2.2.3 angeführten Experimenten konnten beide Antikörper im gleichen Maße die migrationsfördernde Wirkung von TNFα 50 U/ml aufheben (C 2.2.3, C 2.3), was auf eine Wechselwirkung zwischen TNFα und IL-1 hindeutet.

Die zahlreichen Schwankungen in diesen Versuchen kamen zum Teil durch das Verwenden von Antikörpern verschiedener Firmen und Chargen, sowie durch Fehler bei der Versuchsdurchführung bzw. durch die zuvor genannten Probleme der Organkultur zustande (D 11).

Eine Kombination von IL-1β und anti-IL-1β konnte aus Kostengründen und dem zu großen Verbrauch an neutralisierendem Antikörper nicht durchgeführt werden.

Die hier angeführten Ergebnisse werden durch Versuche von Enk und Katz bestätigt (36). Bei intradermaler Injektion von IL-1β zusammen mit neutralisierenden Mengen von anti-IL-1β konnte kein Einfluß von IL-1β auf die Langerhanszellen mehr beobachtet werden. Eine Sensibilisierung mit Kontaktallergen (TNCB) konnte durch vorheriges Spritzen von anti-IL-1β ebenfalls verhindert werden. Beim gleichen Versuch zeigte jedoch anti-IL-1α keine Wirkung.

Rambukkana et al. (61) machten bei ihren Experimenten ähnliche Beobachtungen. Durch Vorinkubation humaner Hautexplantate mit anti-IL-1β konnte eine Inhibierung

der Kontaktallergen-induzierten Langerhanszellwanderung erreicht werden. Der gleiche Effekt konnte mit anti-IL-1α, anti-GM-CSF und anti-TNFα nicht beobachtet werden.

All diese Ergebnisse deuten auf ein sehr komplexes Wechselspiel zwischen IL-1 und TNFα hin. Es bleibt zu klären, welches Zytokin das andere induziert, ob es eine bestimmte Reihenfolge der Induktion gibt, oder ob diese vom Auslöser der Immunantwort abhängig ist.

4 Gibt es eine Kaskade zwischen TNFα und IL-1?

Um die oben gestellte Frage zu beantworten, wurden zehn Experimente durchgeführt, in denen verschiedene Kombinationen von IL-1β und TNFα sowie Antikörper gegen diese verwendet wurden (C 2.3). Die statistische Auswertung der Versuche ergab trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse eine deutliche Migrationssteigerung sowohl durch 2800 bzw. 3000 U/ml IL-1β (Wanderungsrate um 24% erhöht) als auch durch 50 U/ml TNFα (Erhöhung um 21%). Durch Zugabe von anti-TNFα und IL-1β in die Organkultur sank die Wanderungsrate fast auf die 100% der Kontrolle. Der gleiche Effekt war bei Kombination von TNFα und anti-IL-1β/ anti-IL-1α zu beobachten.

Diese Experimente dienten der Abklärung, welches Zytokin die Produktion des anderen induzieren kann. Dazu gibt es zwei Hypothesen:

- Die erste besagt, daß das zuerst gebildete TNFα die Produktion von IL-1β induzieren kann. Durch Neutralisierung von TNFα wäre eine Migrationssteigerung durch Zugabe einer optimalen Dosis IL-1β nicht mehr möglich.
- Bei der zweiten Theorie, die auf einer Induktion von TNFα durch IL-1β basiert, wäre umgekehrt durch Neutralisierung mit anti-IL-1β und Zugabe von TNFα 50 U/ml ebenso keine erhöhte Wanderungsrate mehr feststellbar.

Da aber bei beiden Ansätzen eine Aufhebung der Migrationssteigerung durch Antikörperzugabe auftrat, ist vermutlich keines der beiden Modelle zutreffend.

Dafür scheinen mehrere Erklärungen plausibel:

Erstens wäre es möglich, daß die beiden Zytokine so eng miteinander wechselwirken, daß durch Zugabe von Antikörpern und durch Neutralisation eines der beiden Zytokine das andere nicht mehr vollständig wirken kann. Daraus könnte

man dann schließen, daß sowohl TNFα als auch IL-1β für die Emigration von kutanen dendritischen Zellen erforderlich ist, beide in synergistischer Weise wirken und sich gegenseitig induzieren können.

Zweitens könnte es sein, daß sich die Induktion der Zytokinproduktion in der 48-stündigen Organkultur nicht beobachten läßt, da sie sich innerhalb von einigen Minuten abspielt. Enk und Katz (69) konnten nach Applikation von Kontaktallergenen nach 15 Minuten IL-1β-mRNA und erst nach 30 Minuten TNFα-mRNA nachweisen.

Drittens spielen sich in der Haut bei Stimulation der Emigration so komplexe Vorgänge ab, daß sie sich nicht bis ins Detail mit Hilfe der Organkultur untersuchen lassen. Durch Wechselwirkungen der exogenen und der teilweise noch vorhandenen endogenen Zytokine in Kombination mit den Antikörpern könnten die Ergebnisse verfälscht sein.

Viertens ist aus einer Vielzahl von Publikationen ersichtlich, daß die Kaskade je nach verwendeten Stimulantien, seien es bakterielle Bestandteile oder Kontaktallergene, durch unterschiedliche Induktion des ersten Zytokins TNFα oder IL-1β auch beliebig in beide Richtungen gehen kann. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse mehrerer Arbeiten unterstützt, in denen LPS die TNFα- und IL-1α-Produktion induzieren konnte (50, 70). Hingegen wird durch Applikation von Kontaktallergen zuerst IL-1β-Expression eingeleitet und dann erst die von TNFα (61, 69). Da in der Organkultur der erste Stimulus durch Zugabe eines Zytokins gesetzt wird, führt dies zur Induktion der Expression des jeweils anderen. Die Zugabe von TNFα führt zu einer Induktion der IL-1β-Produktion, umgekehrt kommt es durch einen IL-1β-Zusatz ins Medium zu einer Induktion von TNFα. Somit könnte die Kaskade je nach Bedarf in beide Richtungen ablaufen.

Das genaue Wechselspiel beider Zytokine und der Ablauf der Induktion der Emigration von kutanen dendritischen Zellen bedarf noch weiterer Untersuchungen, jedoch mit zusätzlichen Methoden. Eine Möglichkeit bietet die Verwendung von *knock-out* Mäusen, bei denen entweder das Gen für TNFα oder IL-1β bzw. für deren Rezeptoren abgeschaltet ist. In ersten eigenen Pilotexperimenten mit TNFα/β-defizienten Mäusen war eine ungestörte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur zu beobachten. Durch Zugabe von TNFα 50 U/ml war eine Migrationssteigerung um 56% gegenüber der R10-Kontrolle zu erkennen. In einem Funktionstest (oxidative Mitogenese, (59)) jedoch erwiesen sich die emigrierten Zellen aus den *knock-out* Mäusen als schwächere T-Zellstimulatoren als die

Kontrollzellen aus C57BL/6-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TNFα Einfluß auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen hat, aber für die Emigration nicht absolut notwendig ist. Andererseits könnte es auch sein, daß bei Fehlen von TNFα andere Zytokine, wie z.B. IL-1β, dessen Funktion übernehmen können und so das Ablaufen einer Immunreaktion ermöglicht wird.

In anderen Arbeiten mit TNFα-Rezeptor-*knock-out* Mäusen wurde die Rolle von TNFα weiter untersucht. Die Gruppe um Sauder konnte bestätigen, daß TNFα bei Kontakthypersensibilisierungsreaktionen nicht der Hauptmediator ist. Bei TNFα-Rezeptor-I-defizienten Mäusen konnte eine verstärkte Reaktion nach Applikation von Kontaktallergen (DNFB) beobachtet werden, was auf eine mögliche immunsuppressive und anti-inflammatorische Rolle von TNFα hindeutet (71). Weiters konnten sie feststellen, daß der TNFα-Rezeptor II für die Wanderung der Langerhanszellen aus der Haut in die Lymphknoten notwendig ist, da diese ungestört in TNFα-Rezeptor-I-defizienten Mäusen ablaufen konnte (72).

In Versuchen mit IL-1β-defizienten Mäusen konnten Fantuzzi et al. zeigen, daß IL-1β nicht essentiell für eine Immunantwort auf systemisch verabreichte Lipopolysaccharide ist bzw. daß andere Zytokine dessen Rolle übernehmen können (73). Shornick et al. konnten ebenfalls in IL-1β-defizienten Mäusen eine unveränderte Empfindlichkeit bei endotoxischem Schock, hingegen eine gestörte Reaktion auf Kontaktallergen-Applikation (TNCB) feststellen. Durch intradermale Injektion von IL-1β vor Antigenkontakt konnte dieser Defekt ausgeglichen werden (74). Die Gruppe von Sauder beobachtete bei lokaler Injektion von IL-1-Rezeptor-Antagonist in sensibilisierten Mäusen eine abgeschwächte Reaktion auf Kontaktallergene (75). Somit scheint IL-1β im Gegensatz zu TNFα eine wichtige Rolle bei Hypersensibilisierungsreaktionen, aber eine geringere bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen zu spielen.

5 Bakterielle Bestandteile wie LPS können in der Organkultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern:

Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) können die Migration von dendritischen Zellen aus nicht lymphoidem Gewebe und deren Reifung beeinflussen (50, 76). In mehreren Experimenten wurde der Einfluß von verschiedenen Dosen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur untersucht (C 2.4). Dabei zeigte sich, daß geringe Mengen (10 ng/ml) keine Wirkung auf die Emigration hatten. Ab einer Konzentration von 100 ng/ml stieg die Zahl an ausgewanderten dendritischen Zellen deutlich an und sank bei großen Mengen LPS (1 μg/ml) wieder unter das Niveau der Kontrolle. Die Hemmung der Migration bei hoher Dosis LPS war vergleichbar zur beobachteten Hemmung bei TNFα 5000 U/ml. Daraus kann man entweder auf einen negativen, eventuell toxischen Effekt auf die Zellen oder auf eine starke Induktion von TNFα durch LPS schließen. Durch die hohe Konzentration an TNFα im Gewebe könnte der gleiche Effekt auftreten wie bei Zugabe von hoher Dosis TNFα in die Organkultur.

Diese Erklärung wird durch die Ergebnisse von Verhasselt et al. bestätigt, die beobachten konnten, daß LPS bei Zugabe zu dendritischen Zellkulturen die Produktion einiger Zytokine, wie TNFα, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 dosisabhängig stimulieren kann (70). Die Gruppe von Roake und Austyn (50) konnte nach systemischer Verabreichung von LPS eine Reduktion der Zellzahl in Mäuseherzen und –nieren feststellen. Zusätzlich war die Zahl der Langerhanszellen in der Epidermis verringert und *cords* waren in der Dermis sichtbar. Bei systemischer Verabreichung von IL-1 und TNFα waren ähnliche Effekte zu sehen. Eine vorherige Gabe von anti-TNFα verhinderte die durch LPS induzierte Auswanderung von Langerhanszellen aus der Haut, aber nicht die von dendritischen Zellen aus Herz und Niere.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit LPS war bei Zugabe von anti-TNFα (V1q) in die Organkultur ebenfalls eine Reduktion der Zahl an emigrierten Zellen im Medium erkennbar. Bei Zugabe einer Kombination von anti-IL-1β und anti-IL-1α war die gleiche bzw. eine stärkere Hemmung der Migration sichtbar (C 2.4).

Aus diesen Daten kann man auf eine indirekte Wirkung bakterieller Bestandteile, wie

zum Beispiel LPS, auf die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen schließen. Dieser Einfluß von LPS ist auf eine Stimulation der Produktion diverser Zytokine zurückzuführen. In der Haut wird TNFα und IL-1α induziert, die, wie bereits besprochen, die Kaskade in Richtung IL-1β induzieren und zusammen die Emigration der Zellen auslösen. Um diesen Zyklus weiter zu führen, kann LPS über diverse Zytokine (eventuell GM-CSF, IL-6, Chemokine) Vorläufer kutaner dendritischer Zellen in die Dermis rekrutieren. Tatsächlich konnten Roake und Austyn in weiteren Arbeiten neben der Auswanderung der dendritischen Zellen durch systemische Verabreichung von LPS eine Rekrutierung von ihren Vorläufern in Herz, Niere und Dermis feststellen (76).
In den unter C 4.4 angeführten Elisa-Messungen war nach Zugabe von LPS in die Organkultur eine leichte GM-CSF- und auch IL-1β-Zunahme zu beobachten. TNFα hingegen war in keiner der drei Messungen nachweisbar, obwohl LPS die Produktion von TNFα stimulieren kann (70). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, daß Probleme beim Nachweis dieses Zytokins im Elisa auftraten.

6 Chemokine wie MIP-1α haben Einfluß auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Chemokin MIP-1α auf einen möglichen Einfluß in der Organkultur getestet, weil es zusammen mit MIP-2 in Langerhanszellen der Epidermis von Mäusen gebildet wird (32).
Dieses Chemokin zeigte eine dosisabhängige Wirkung auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen, wie es auch bei TNFα, IL-1 und LPS zu beobachten war. In sieben Experimenten (C 2.5) konnte bei einer Konzentration von 10 ng/ml MIP-1α eine Hemmung der Wanderung beobachtet werden. Ab einer Menge von 20 ng/ml schwankten die Zellzahlen um die Werte der Kontrolle (R10 ohne Zusätze) und deuteten teilweise auf eine Migrationssteigerung hin. Bei einer Zugabe von 40 ng/ml und 70 ng/ml MIP-1α ins Medium war meist eine Erhöhung der Wanderungsrate erkennbar. Die hohe Dosis MIP-1α (100 ng/ml) führte zu einer Reduktion der Emigration auf das Niveau der Kontrolle.
Diese Daten werden durch Arbeiten von Sozzani et al. unterstützt (40). Sie konnten eine Wanderung von dendritischen Zellen aus humanem Blut entlang eines positiven

Gradienten von C-C-Chemokinen, darunter MIP-1α, und anderen chemotaktischen Agenzien in einer Chemotaxis-Mikrokammer nachweisen. Die gleichen Ergebnisse erzielten Xu und Wang mit CD1a-positiven kultivierten dendritischen Zellen aus humanem Nabelschnurblut (77). Die C-C-Chemokine MCP-1 und MCP-2 konnten diese Zellen in der oben erwähnten Kammer zur Migration stimulieren. MIP-1α wurde in diesen Versuchen nicht getestet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde MIP-1α 40 ng/ml mit anti-TNFα bzw. anti-IL-1β in der Organkultur kombiniert, um ein mögliches Zusammenspiel mit inflammatorischen Zytokinen zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Beide Antikörper konnten die migrationsfördernde Wirkung von MIP-1α aufheben. Diese Daten deuten auf einen möglichen indirekten Einfluß von MIP-1α über TNFα und IL-1β auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen hin.

Eine andere Erklärung für die erhöhten Zellzahlen im Medium mit MIP-1α-Zusatz wäre, daß das Chemokin Vorläufer der Langerhanszellen von der Dermis in die Epidermis rekrutiert und daher zu einer verstärkten Auswanderung führt. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Nakamura et al. bestärkt (41). Hierbei konnte mit einem transgenen Mausmodell nachgewiesen werden, daß ein anderes Chemokin, nämlich MCP-1, dendritische Zellen und Langerhanszellen in die Haut rekrutieren kann. Bei verstärkter Bildung von MCP-1 in der basalen Schicht der Epidermis war die Zahl der Langerhanszellen unverändert. Jedoch war eine große Zunahme an MHC-Klasse-II-positiven Zellen in der Dermis zu sehen, die meist an der epidermal-dermalen Junktionszone zu finden waren.

Die genaue Wirkung von MIP-1α und anderen Chemokinen in der Haut und deren Einfluß auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen erfordert noch weitere Untersuchungen.

7 IL-4 und IL-10 haben keinen Einfluß in der Organkultur:

In dieser Arbeit wurde die Wirkung zwei weiterer Zytokine auf die Wanderung kutaner dendritischer Zellen untersucht. IL-4 und IL-10, die beide eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Lymphozyten und der Inhibierung der Monozyten/ Makrophagenaktivierung und –funktion spielen, wurden dabei getestet.

Die Annahme war, daß es bei Zugabe von IL-4 in die Organkultur zu einer verstärkten Migration kommen könnte. Vielleicht kann dieses Zytokin Vorläuferzellen in der

Haut dazu stimulieren, sich zu Langerhanszellen bzw. zu dermalen dendritischen Zellen zu entwickeln. Sowohl 200 U/ml als auch 400 U/ml IL-4 zeigten im ersten Versuch eine hemmende Wirkung, im zweiten hingegen keinen Einfluß auf die Emigration, da die Zellzahlen auf dem Niveau der Kontrolle lagen (C 2.6). Die emigrierten Zellen besaßen ein schöneres dendritisches Aussehen mit deutlicher ausgebildeten *veils* als die Zellen im reinen R10-Medium. Aus diesen Daten kann man auf einen Einfluß von IL-4 auf die Reifung der auswandernden kutanen dendritischen Zellen schließen. Die Wanderung selbst kann durch Zugabe von IL-4 jedoch nicht gesteigert werden.

Diese Annahme leitet sich aus Arbeiten von Sallusto und Lanzavecchia (62) sowie Romani et al. (45) ab. Aus dem peripheren Blut isolierte Monozyten können sich bei Kultivierung über 10 Tage mit GM-CSF und IL-4 zu reifen dendritische Zellen entwickeln.

IL-10 ist ein Antagonist von verschiedenen Zytokinen, darunter TNFα, IL-1β und MIP-1α. Es wäre also vorstellbar, daß durch Neutralisation dieses Interleukins die Emigration von kutanen dendritischen Zellen verstärkt werden kann, da dann die inflammatorischen Zytokine besser wirken könnten. In der Organkultur zeigte sich jedoch das Gegenteil, da durch Zugabe von 10 µg/ml und 20 µg/ml anti-IL-10 eine Hemmung der Wanderung auftrat, die annähernd auf dem Niveau von TNFα 5000 U/ml lag (C 2.6). Die Zellen hatten keine so deutlichen *veils*, wie bei Zugabe von IL-4.

Buelens et al. konnten zeigen, daß IL-10 die Entwicklung von dendritischen Zellen aus PBMC trotz GM-CSF und IL-4 in der Kultur hemmen kann (42). IL-10 scheint durch seine antagonistische Wirkung die Entwicklung und Wanderung von Monozyten und dendritischen Zellen zu unterdrücken.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß beide Zytokine keinen bzw. einen leicht negativen Effekt in der Organkultur zeigten. Die Frage, ob sie die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen können, oder ob die verwendeten Dosen in der Organkultur nicht optimal waren, bleibt noch zu klären.

8 GM-CSF erhöht die Zellviabilität und beschleunigt die Reifung der kutanen dendritischen Zellen:

GM-CSF, das bekanntlich die Reifung von dendritischen Zellen induzieren kann (45, 53), wurde in der Organkultur auf Einfluß auf die Wanderung und die Zellviabilität untersucht. In mehreren Versuchen waren schwankende Ergebnisse bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen GM-CSF zu sehen (C 3.1). Der Zusatz von 2000 U/ml und 5000 U/ml während der 48-stündigen Organkultur führte teilweise zu einer leichten Zellzahlerhöhung, manchmal aber auch zu einer geringen Zellzahlerniedrigung. Unter dem Mikroskop waren schöne Zellen mit deutlichen *veils* erkennbar. Dies deutet auf eine Wirkung von GM-CSF auf die Zellviabilität und Reifung der emigrierten Zellen hin. Die Wanderung wird durch dieses Zytokin nicht wesentlich beeinflußt. Die Zellzahlerhöhung kommt durch die größere Überlebensrate der ausgewanderten Zellen im Medium oder aufgrund einer Induktion der Emigration durch die beschleunigte Reifung zustande.

Bei diesen Versuchen wurde unter anderem die Wirkung von TNFα und GM-CSF auf bereits emigrierte kutane dendritische Zellen getestet. Dazu wurde zu Zellen, die in den ersten 24 Stunden der Organkultur ausgewandert waren, TNFα in verschiedenen Dosen (50, 100, 5000 U/ml) und GM-CSF 1000 U/ml zugegeben. Bei der anschließenden Zählung konnten teilweise erhöhte Zellzahlen festgestellt werden, wobei die Zellen wiederum ein schöneres dendritisches Aussehen aufwiesen als Zellen aus reinem R10-Medium bzw. Zellen aus den 48 Stunden-Kulturen.

In einem Zusatzversuch konnte nachgewiesen werden, daß allein der Mediumwechsel während der Organkultur einen positiven Effekt auf die Zellen hatte. Durch die Zufuhr frischer Nährstoffe und Zytokine und aufgrund des stabileren pH-Wertes, der ansonsten während der 48 Stunden-Kultur abnahm, starben einerseits weniger Zellen ab, andererseits kam es zu einer besseren Ausreifung. Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, daß in der zweiten Hälfte der Organkultur (24-48 Stunden) mehr Zellen auswanderten als in den ersten 24 Stunden, wie bereits Ortner in ihrer Arbeit feststellen konnte (47).

Die Erhöhung der Zellviabilität und die Reifung von Langerhanszellen durch GM-CSF und TNFα konnte bereits in Versuchen von Caux et al. gezeigt werden (78). Heufler et al. (37) und Witmer-Pack et al. (46) beobachteten die Reifung und Erhöhung der Viabilität von Langerhanszellen in angereicherten Kulturen durch Zusatz von

GM-CSF und IL-1. In Versuchen von Koch et al. mit TNFα (35) zeigte sich, daß TNFα die Viabilität von murinen Langerhanszellen ebenfalls erhöhen, aber im Gegensatz zu GM-CSF die funktionelle Reifung nicht vollständig induzieren kann.
Ein möglicher Einfluß von GM-CSF auf die Migration von kutanen dendritischen Zellen könnte durch die verstärkte Reifung und die daraus resultierende Induktion der Auswanderung bedingt sein. Im Humansystem wurde eine Wanderung von Langerhanszellen *in vitro* nach GM-CSF-Zugabe in einer Chemotaxis-Mikrokammer beobachtet (79). In einer Arbeit von O´Sullivan et al. konnte eine Zunahme der Ia-positiven Langerhanszellen in der Epidermis nach Kultur von Maushaut mit GM-CSF nachgewiesen werden (80), was auf eine Regulation der Langerhanszellzahl durch GM-CSF hindeutet.
Interessante Ergebnisse ergaben sich bei den Messungen von GM-CSF in den Überständen der Organkultur, denn in allen war GM-CSF zu finden (C 4.3). Es zeigte sich sogar eine Zunahme der Konzentration bei Zusatz von TNFα und IL-1β in die Kultur. Diese Daten deuten darauf hin, daß durch inflammatorische Zytokine induziertes GM-CSF bei der Emigration von kutanen dendritischen Zellen eine wichtige Rolle spielt.

9 Mögliches Zusammenspiel der Zytokine der Haut:

Das *in situ* vorhandene **GM-CSF**, das ständig von Keratinozyten neu gebildet wird, kann mit Hilfe von **TNFα und IL-1**β, die die Expression des GM-CSF-Rezeptors hinaufregulieren, die Reifung der Langerhanszellen in der Epidermis fördern und sie somit zur Auswanderung stimulieren. TNFα und IL-1β können in einem sehr engen Wechselspiel kaskadenartig die Produktion des jeweils anderen Zytokins beeinflussen und gemeinsam die Migration vor allem von Langerhanszellen, aber auch die von dermalen dendritischen Zellen steigern. Die Auswanderung der Langerhanszellen wird dadurch ermöglicht, daß beide Zytokine in der Lage sind, die bestehende Verankerung über E-cadherin zwischen den Keratinozyten und Langerhanszellen zu lösen. In mehreren Arbeiten von Udey und Schwarzenberger wurde die Funktion und das Vorkommen von E-cadherin, einem Calcium-abhängigen homophilen Adhäsionsmolekül, untersucht. Sie konnten zeigen, daß E-cadherin von murinen dendritischen Zellen in Haut-assoziierten Lymphknoten und frisch präparierten Langerhanszellen exprimiert wird und der Lokalisation von

Langerhanszellen in der Epidermis dient (81). Nach Applikation des Kontaktallergens TNCB war, wie bei emigrierten und kultivierten Langerhanszellen, eine verminderte E-cadherin-Expression zu erkennen. Der gleiche Effekt war nach Injektion von TNFα und IL-1β in Ohrhaut zu beobachten (82). Somit führt eine verringerte E-cadherin-Expression durch lokale Zytokinproduktion nach Antigenkontakt zur Emigration und Initiation einer Immunantwort. **LPS**, das im Falle eines mikrobiellen Angriffs das auslösende Agens ist, kann durch Induktion von TNFα und **IL-1α** indirekt die Emigration kutaner dendritischer Zellen auslösen. Das Chemokin **MIP-1α** kann Vorläuferzellen aus der Dermis in die Epidermis rekrutieren und/oder die Wanderung der Langerhanszellen auf indirektem Weg über TNFα und IL-1β fördern.

10 Untersuchung der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Rasterelektronenmikroskopie:

Für die morphologischen Untersuchungen wurden kutane dendritische Zellen *in situ* in kultivierter und unkultivierter Haut und *in vitro* in Zellsuspension nach Isolierung, Reinigung und teilweiser Kultivierung mit verschiedenen Markern gefärbt (C 5). Der Antikörper **In-1**, der an die invariante Kette binden kann (55), wurde auf Langerhanszellen aller Reifungsstadien *in situ* und *in vitro* nachgewiesen. Das deutet auf eine ständige Präsenz dieses Moleküls hin, das bei unreifen dendritischen Zellen als Indikator für die Fähigkeit zu prozessieren dient. Es war jedoch zu beobachten, daß die Färbung in der unkultivierten Epidermis am stärksten war (Abb. 34), was eine hohe invariante Kette-Expression bei prozessierenden Langerhanzellen beweist. In kultivierter und unkultivierter Dermis war auf dermalen dendritischen Zellen und emigrierenden Langerhanszellen in *cords* In-1-Expression nachweisbar.
Daß die invariante Kette bei der Reifung der Zellen nicht verloren geht, deutet entweder auf noch teilweise unreife Zellen in der Suspension, da die Reifung nicht synchron stattfindet (83), oder auf Restmoleküle durch einen langsamen Abbau in den Zellen hin.
Der Reifungsmarker **2A1** (53) konnte nur auf reifen dendritischen Zellen (Abb. 35) und nicht auf Langerhanszellen in unkultivierter Haut nachgewiesen werden. Sehr schön war die Auswanderung der Langerhanszellen in den *cords* zu beobachten, in

denen einige In-1-positive und einige 2A1-positive Langerhanszellen zu sehen waren (Abb. 36, 37). Dies ist auch ein Indiz dafür, daß wahrscheinlich nicht alle Zellen zu Beginn der Wanderung reif sind, sondern erst während ihrer Wanderung oder im Medium ausreifen.
Durch die Organkultur und ergänzende Immunfluoreszenzfärbungen lassen sich Erkenntnisse über die Wanderungs- und Reifungsmechanismen der Langerhanszellen der Epidermis gewinnen, da durch Färbungen der epidermalen *sheets* nach der Organkultur Veränderungen in der Zelldichte erkennbar sind. In wie weit die dermalen dendritischen Zellen in der Organkultur eine Rolle spielen, kann nur durch getrennte Epidermis- und Dermis-Kultur untersucht werden.

Aus den **Rasterelektronenmikroskopie**fotos ist der Verlauf einer epidermalen Organkultur gut erkennbar (C 6.1.1, Abb. 38). Die ersten Langerhanszellen erscheinen kurz nach Beginn der Kultur, wahrscheinlich schon innerhalb einer Stunde. Diese emigrierenden Zellen könnten sich bereits beim Tod der Maus auf Wanderung befunden haben und sind deshalb nicht auf die Kultivierung zurückzuführen. Erst ab einer Kulturzeit von 15 Stunden waren Zellen mit deutlichen *veils* zwischen den Epithelzellen zu erkennen. Die Zahl der emigrierenden Zellen nahm während der weiteren Kultur beständig zu, wobei nach 25 Stunden Kultur ein beginnender Zerfall des Epithels zu sehen war. Daher könnten einige Zellen bei der Kultur von Epidermis passiv ins Medium gelangt sein.
Bei der Betrachtung der Dermisunterseite einer ganzen kultivierten Ohrhälfte waren ebenfalls auswandernde dendritische Zellen zwischen den Bindegewebsfasern und Fibrozyten sichtbar, wobei nach 48 Stunden Kultur noch kein Zerfall zu sehen war (C 6.1.2, Abb. 39-41). Es waren keine Öffnungen von Lymphbahnen zu erkennen, und die Verteilung der emigrierenden Zellen war eher zufällig. Diese Beobachtung widerspricht den Daten aus den Immunfluoreszenzfärbungen, wo deutliche Anhäufungen der Zellen in *cords* in der Dermis zu beobachten waren. Es wäre möglich, daß die Lymphgefäße durch Trennung der Ohrhälften vor der Kultur so zerstört werden, daß sie nicht mehr zu erkennen sind. Weiters wäre ein Wanderungsweg der dendritischen Zellen nicht nur entlang der Lymphbahnen, sondern auch diffus durch das Bindegewebsgeflecht eine Erklärung für die zufälligen Austrittsorte der Zellen. Diese Annahme wird durch unveröffentlichte Beobachtungen von Mitarbeitern von Romani bestätigt, die in der Transmissionselektronenmikroskopie Lücken in den *cords* feststellen konnten. Durch offene Enden des

Lymphgefäßsystems könnten kutane dendritische Zellen in das Bindegewebe der Dermis und über dieses in ein Sammelgefäß an der Basis des Ohres gelangen, von wo aus die weitere Wanderung in die Lymphknoten stattfindet.
Die Rasteruntersuchungen der ausgewanderten Zellen nach 24 und 48 Stunden aus der Epidermis und der Dermis zeigten einen leichten Unterschied in der Form und in der Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen nach 24 Stunden (C 6.2, Abb. 42, 43). Die in 48 Stunden emigrierten Zellen hatten teilweise schon deutliche *veils* ausgebildet (Abb. 44, 45). Die Zahl der dermalen dendritischen Zellen und teilweise auch ihre Größe war geringer als die der Langerhanszellen (Beobachtungen im Lichtmikroskop). Beim Vergleich der *in situ* (Organkultur) und der *in vitro* gereiften (EC-Suspension) Langerhanszellen waren keine Unterschiede zu sehen (C 6.2, Abb. 46, 47).

11 Kritik an der Organkultur:

Die bei dieser Arbeit verwendete Methode ist ein gutes Modell, um die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen zu untersuchen. Durch Trennung von Epidermis und Dermis mit Hilfe der Dispase wäre eine getrennte Untersuchung der Langerhanszellwanderung und der von dermalen dendritischen Zellen möglich. Da sie aber aufwendig ist und die Epidermis nach bereits 25 Stunden Kultur Zerfallserscheinungen zeigte (C 6.1.1), wurde die Kultur mit der kompletten Ohrhaut durchgeführt. Eine Unterscheidung der beiden Zelltypen war somit nicht möglich, aber durch Versuche mit getrennten Kulturen ist bekannt, daß ein Teil der Zellen im Kulturüberstand aus der Epidermis stammt und ein Teil dermaler dendritischer Zellen mitauswandert.
Einige Probleme der Organkultur waren bereits von Ortner und Zanella (47, 48) beseitigt worden, dennoch waren noch weitere Fehlerquellen vorhanden. Um die Wirkung von exogen zugegebenen Zytokinen und Antikörpern zu testen, mußte die endogene Zytokinproduktion abgeschaltet werden. Durch eine Vorinkubation der Ohren bei +4°C über 26 bis 28 Stunden wurde dies erreicht. Trotzdem sind Verfälschungen der Ergebnisse durch noch wirksame endogene Zytokine und während der Kultur gebildete Zytokine nicht auszuschließen. Dies ist das Hauptproblem der Organkultur, da durch das Vorhandensein einer spontanen Migration kein ruhendes System vorliegt, sondern versucht wird, ein laufendes zu bremsen oder zu beschleunigen.

UBI

Während der 48-stündigen Organkultur war eine Gelbfärbung des Mediums zu beobachten, was auf eine Senkung des pH-Wertes hindeutet. Diese pH-Senkung und der Verbrauch der Nährstoffe hatten teilweise einen negativen Effekt auf die Zellen, was zu Deformation und undeutlicher Ausbildung der *veils* führte. Dadurch bedingt traten Zählfehler auf. Da aber ein Wechsel des Mediums aufgrund des hohen Verbrauchs an Zytokinen und Antikörpern nicht möglich war, wurde die Kultur meist über 48 Stunden mit dem gleichen Medium durchgeführt.

In vielen Experimenten waren große Schwankungen der Zellzahlen zu beobachten, sodaß die Befunde bezüglich Migrationsteigerung und –hemmung nicht eindeutig zu interpretieren waren. Diese Unterschiede kamen durch Fehler bei der Versuchsdurchführung zustande. Bei der Herstellung der Medien wurden geringe Mengen an Zytokinen und Antikörpern zu großen Mengen R10-Medium pipettiert, wobei es leicht zu Pipettierfehlern kommen konnte. Durch die Verwendung von Reagenzien verschiedener Firmen und Chargen traten zusätzliche Schwankungen auf. Auch die Wirksamkeit der Substanzen in diesem System war nicht immer nachgewiesen.

Die größte Fehlerquelle liegt aber in der Zählung der Zellen in der Zählkammer. Durch ungenügende Resuspendierung der Zellpellets, durch Klumpung der Zellen, falsches Pipettieren und die bereits erwähnte undeutliche Ausbildung der *veils* kam es schnell zu Zählfehlern. Die Standardabweichung bei zwei- oder dreimaliger Zählung war teilweise sehr groß, weil zwischen mehreren Zählungen der gleichen Probe deutliche Unterschiede in der Zellzahl auftraten.

Aus diesen hier genannten Gründen ist die Methode der Organkultur zur Bestimmung der Wirkung verschiedener Zytokine und Antikörper auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen nur eingeschränkt verwendbar. Es lassen sich eindeutig Tendenzen aus den Zählungen der Kulturen ablesen, aber zur endgültigen Interpretation der Ergebnisse bedarf es ergänzender Methoden. Zu diesen zählen Versuche mit *knock-out* Mäusen, denen durch Ausschalten von Genen verschiedenste Zytokine und Rezeptoren fehlen; weiters die Analyse der Zytokine in der Organkultur auf mRNA-Ebene mit PCR, Northern Blots und *in situ* Hybridisierung bzw. auf Protein-Ebene mit Elisa.

E. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Emigration von kutanen dendritischen Zellen untersucht. Der Einfluß von verschiedenen Zytokinen wurde mit dem Organkultur-modell nach Larsen getestet.

Dabei zeigte sich, daß **TNFα** in niedriger Dosis (50 U/ml) und **IL-1β** in hoher Dosis (2800/3000 U/ml) die Migration steigern können. Hingegen wirkte die hohe Dosis TNFα (5000 U/ml) hemmend auf die Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen. Diese Hemmung war aber nicht durch die Toxizität des Zytokins bedingt, sondern sehr wahrscheinlich durch eine Inhibierung der Wanderung in den Lymphbahnen der Dermis. Durch Zugabe von Antikörpern gegen TNFα und IL-1β in die Organkultur konnte die migrationsfördernde Wirkung von 50 U/ml TNFα aufgehoben und die Wanderungsrate im reinen Medium durch Neutralisierung des endogenen TNFα und IL-1β verringert werden. Die Frage, ob in einer Kaskade TNFα die Produktion von IL-1β induzieren kann oder im umgekehrten Fall IL-1β TNFα-Expression bewirkt, konnte nicht geklärt werden. Die Ergebnisse deuten auf eine sehr komplexe und synergistische Wechselwirkung der beiden inflammatorischen Zytokine hin.

Als Induktor einer Immunantwort wurden verschiedene Konzentrationen von Lipopolysaccharid (**LPS**) auf ihren Einfluß auf die Migration in der Organkultur getestet. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von LPS. In niedriger Konzentration (100 ng/ml) kann es die Wanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen erhöhen, in hoher Dosis führt es wahrscheinlich durch Induktion von großen Mengen TNFα zu einer Inhibierung der Wanderung ähnlich wie TNFα 5000 U/ml. Durch Zugabe von anti-TNFα konnte die migrationsfördernde Wirkung von LPS wieder aufgehoben werden.

Das Chemokin **MIP-1α** (40 und 70 ng/ml) zeigte in mehreren Versuchen eine leichte Steigerung der Migrationsrate. Dieser Effekt ist durch eine mögliche Rekrutierung von Vorläuferzellen aus der Dermis und/oder eine indirekte Beeinflussung der Emigration über TNFα und IL-1β zu erklären.

Die Interleukine **IL-4** und **IL-10** führten zu keiner Veränderung der Migrationsrate bzw. eher zu einer Inhibierung der Wanderung. IL-4 führte in der Organkultur zu einer Reifung der Zellen, was durch Ausbildung von deutlichen *veils* erkennbar war.

Bei Zugabe von anti-IL-10 kam es zu einer Reduktion der Zahl der emigrierenden Zellen.

Die Experimente mit **GM-CSF** zeigten eine leichte Erhöhung der Zahl an ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen, wobei die Ergebnisse nicht eindeutig waren. Diese Zellzahlerhöhung ist auf eine gesteigerte Zellviabilität durch GM-CSF-Zusatz ins Medium und eine Induktion der Reifung und dadurch bewirkte Auslösung der Emigration bedingt.

In morphologischen Untersuchungen mit den zwei DC-Markern **In-1** und **2A1** konnte ein konstantes Vorkommen der invarianten Kette in kutanen dendritischen Zellen und eine Expression von 2A1 nur auf reifen Zellen nachgewiesen werden. In den *cords* der Dermis waren emigrierende MHC-Klasse-II-positive Zellen zu erkennen, die je nach Reifungsgrad In-1 oder 2A1 exprimierten. Aus dieser Beobachtung kann man schließen, daß der Reifungsprozeß der Langerhanszellen bereits in der Epidermis, beginnt, sich aber während der Wanderung zu den Lymphknoten fortsetzt.

In den **rasterelektronenmikroskopischen** Untersuchungen der Epidermis- und Dermisunterseite waren emigrierende kutane dendritische Zellen zwischen den Epithelzellen bzw. im Bindegewebsgeflecht zu sehen. Die Auswanderung wirkte diffus und nicht auf Lymphbahnen konzentriert, was für eine zusätzliche Wanderung der Zellen durch das Bindegewebe der Dermis spricht. Bei der Betrachtung der kultivierten epidermalen Zellsuspension und der epidermalen und dermalen dendritischen Zellen, die in 24 bzw. 48 Stunden aus den Hautschichten ausgewandert waren, waren kaum Unterschiede in der Ausbildung der Zytoplasmafortsätze erkennbar. Somit unterscheiden sich die *in situ* und *in vitro* gereiften kutanen dendritischen Zellen rein optisch nicht.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß TNFα, IL-1β, GM-CSF und MIP-1α synergistisch die Emigration von kutanen dendritischen Zellen regulieren. Um genauere Aussagen über das Wechselspiel dieser Zytokine machen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

F. Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
C3	zentrales Protein des Komplementsystems
CD	Differenzierungscluster
DC	dendritische Zelle
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
Fc-Rezeptor	Oberflächenrezeptor für den Fc-Teil der Immunglobuline
FCS	Fetales Kälberserum
FG	Formaldehyd-Glutaraldehyd-Fixativ (Karnovsky´s)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
LC	Langerhanszelle
LFA	Lymphozyten-funktionsassoziiertes Antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Monozyten-chemotaktisches Protein
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
OXMI	oxidative Mitogenese
PBS	Phosphatpuffer
PMA	Phorbol Myristat Azetat
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
UV-Strahlen	ultraviolette Strahlen

Glossar:

Cluster	Zellaggregate zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen
cords	Ansammlungen von kutanen dendritischen Zellen in den Lymphbahnen der Dermis
R10	verwendetes Medium mit 10% FCS
sheets	Häutchenpräparate der Epidermis und Dermis
veils	segelartige Fortsätze der dendritischen Zellen

wells	Vertiefungen der Gewebekultur- und Elisaplatten
Vorinkubation	Zeit zwischen dem Abschneiden der Ohren und der Organkultur
Zytos	Zytozentrifugationen

Die CD-Antigene:

Tab. 32: Liste aller erwähnter Differenzierungscluster (CD)

CD-Antigen	Zellen, die das Antigen präsentieren	Funktionen	andere Bezeichnungen
CD11b	myeloide Zellen und natürliche Killerzellen	Untereinheit des Integrins CR3, bindet CD54, iC3b und extrazelluläre Matrixmoleküle	Mac-1
CD11c	myeloide Zellen	Untereinheit des Integrins CR4, bindet Fibrinogen	gp150, 95
CD18	Leukozyten	Untereinheit der Integrine, bindet an CD11a, b und c	
CDw32	Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, eosinophile Zellen	niedrigaffiner Fc-Rezeptor für aggregierte Immunglobuline oder Immunkomplexe	FcγRII
CD40	B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen	Rezeptor für costimulierendes Signal für B-Zellen, bindet den CD40-Liganden (CD40-L)	gp50
CD44	Leukozyten, Erythrozyten	bindet Hyaluronsäure, vermittelt die Adhäsion der Leukozyten	Hermes-Antigen, Pgp-1
CD45	Leukozyten	Tyrosinphosphatase, erhöht Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen	leucocyte common antigen (LCA), T200
CD54	hämatopoetische und nicht hämatopoetische Zellen	interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1, bindet die Integrine LFA-1 und Mac-1	ICAM-1
CD58	hämatopoetische und nicht hämatopoetische Zellen	leukocyte function-associated antigen-3 (LFA-3), bindet CD2, Adhäsionsmolekül	LFA-3
CD80	Untergruppe von B-Zellen	Costimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4	B7.1, BB1
CD86	Monozyten, aktivierte B-Zellen	unbekannt	FUN-1, GR65
CD115	Monozyten, Makrophagen	Rezeptor für M-CSF	M-CSFR, c-mfs

G. Referenzen

1. Steinman R. M., Cohn Z. A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J. Exp. Med. 137: 1142-1162.
2. Inaba K., Inaba M., Deguchi M., Hagi K., Yasumizu R., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M., 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritc cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3038-3042.
3. Lutz M. B., Girolomoni G., Ricciardi-Castagnoli P., 1996. The role of cytokines in functional regulation and differentation of dendritic cells. Immunobiol. 195: 431-455.
4. Stingl G., Wolff-Schreiner E. C., Pichler W. J., Gschnait F., Knapp W., 1977. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. Nature 268:245-246.
5. Schuler G., Steinman R. M., 1985. Murine epidermal Langerhasn cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. Exp. Med. 161: 526-546.
6. Takashima A., Edelbaum D., Kitajima T., Shadduck R. K., Gilmore G. L., Xu S., Taylor R. S., Bergstresser P. R., Arizumi K., 1995. Colony-stimulating factor-1 secreted by fibroblasts promotes the growth of dendritic cell lines (XS series) derived from murine epidermis. J. Immunol. 154: 5128-5135.
7. Schuler G., 1991. In Epidermal Langerhans Cells. Schuler G., editor. CRC Press Inc. Boca Raton. FL.
8. Rambukkana A., Bos J. D., Irik D., Menko W. J., Kapsenberg M. L., Das P. K., 1995. In situ behaviour of human Langerhans cells in skin organ culture. Lab. Invest. 73: 521-531.
9. Larsen C. P., Steinman R. M., Witmer-Pack M., Hankins D. F., Morris P. J., Austyn J. M., 1990. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. J. Exp. Med. 172: 1483-1493.
10. Jiang W., Swiggard W. J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R. M., Nussenzweig M. C., 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature 375: 151-155.
11. Steinman R. M., 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol. 9: 271-296.
12. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. J. Exp. Med. 182: 389-400.
13. Austyn J. M., 1996. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. J. Exp. Med. 183: 1287-1292.
14. Steinman R. M., Metlay J., Bhardwaj N., Freudenthal P., Langhoff E., Crowley M., Lau L., Witmer-Pack M., Young J. W., Pure E., Romani N., Inaba K., 1990. Dendritic cells: nature´s adjuvant. In Immunogenicity, Vol 113. Janeway C. A. J., Sprent J., Sercarz E., editors. Alan R. Liss Inc. New York. 155-165.

15. Inaba K., Steinman R. M., 1986. Accessory cell-T lymphocyte interactions. Antigen-dependent and antigen-independent clustering. J. Exp. Med. 163: 247-261.
16. Inaba K., Romani N., Steinman R. M., 1989. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T-cell-proliferative responses to dendritic cells. J. Exp. Med. 170: 527-542.
17. Ibrahim M. A. A., Chain B. M., Katz D. R., 1995. The injured cell: The role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. Immunol. Today 16: 181-186.
18. Streilein J. W., 1989. Skin-associated lymphoid tissue. In immune mechanisms in cutaneous disease. Norris D. A., editor. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 73-96.
19. Frick. H, Leonhardt H., Starck D., 1992. Allgemeine Anatomie, Spezielle Anatomie I, 4. Auflage, S. 164.
20. Lenz A., Heine M., Schuler G., Romani N., 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. J. Clin. Invest. 92: 2587-2596.
21. Kraal G., Breel M., Janse M., Bruin G., 1986. Langerhans´cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. J. Exp. Med. 163: 981-997.
22. Puré E., Inaba K., Crowley M. T., Tardelli L., Witmer-Pack M. D., Ruberti G., Fathman G., Steinman R. M., 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cell correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. J. Exp. Med. 172: 1459-1469.
23. Cumberbatch M., Kimber I., 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.
24. Inaba K., Metlay J. P., Crowley M. T., Steinman R. M., 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.
25. Matsue, H., Cruz Jr. P. D., Bergstresser P. R., Takashima A., 1992. Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1β and MIP-1α among unstimulated mouse epidermal cells. J. Invest. Dermatol. 99: 537-541.
26. Gearing A. J., Fincham N. J., Bird C. R., Wadhwa M., Meager A., Cartwright J. E., Camp R. D., 1990. Cytokines in skin lesions of psoriasis. Cytokin 2: 68-70.
27. Chodakewitz J. A., Lacy J., Edwards S. E., Birchall N., Coleman D. L, 1990. Macrophage colony-stimulating factor production by murine and human keratinocytes: Enhancement by bacterial lipopolysaccharide. J. Immunol. 144: 2190-2196.
28. Schreiber S., Kilgus O., Payer E., Kutil R., Elbe A., Mueller C., Stingl G., 1991. Cyokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. J. Immunol. 149: 3525-3534.
29. Köck A., Schwarz T., Kirnbauer R., Urbanski A., Perry P., Ansel J. C., Luger T. A., 1990. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. J. Exp. Med. 172: 1609-1618.
30. Kirnbauer R., Köck A., Schwarz T., Urbanski A., Krutmann J., Borth W., Damm D., Shipley G., Ansel J. C., Luger T. A., 1989. IFN-β 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. J. Immunol. 142: 1922-1928.

31. Enk A. H., Katz S. I., 1992. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. J Immunol. 149: 92-95.
32. Heufler C., Topar G., Koch F., Trockenbacher B., Kämpgen E., Romani N., Schuler G., 1992. Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: IL-1β and macrophage inflammatory protein 1α are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. J. Exp. Med. 176: 1221-1226.
33. Larrick J. W., Morhenn V., Chiang Y. L., Shi T., 1989. Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. J. Leukocyte Biol. 45: 429-433.
34. Cumberbatch M., Fielding I., Kimber I., 1994. Modulation of epidermal Langerhans´cell frequency by tumour necrosis factor-α. Immunology 81: 395-401.
35. Koch F., Heufler C., Kämpgen E., Schneeweiss D., Böck G., Schuler G., 1990. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor without inducing their functional maturation. J. Exp. Med. 171: 159-171.
36. Enk A. H., Angeloni V. L., Udey M. C., Katz S. I., 1993. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1β in the initiation of primary immune responses in skin. J. Immunol. 150: 3698-3704.
37. Heufler C., Koch F., Schuler G., 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. J. Exp. Med. 167: 700-705.
38. Berkman N., John M., Roesems G., Jose P. J., Barnes P. J., Chung K. F., 1995. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1α expression by IL-10. J. Immunol. 155: 4412-4418.
39. Cook D. N., Beck M. A., Coffman T. M.,Kirby S. L., Sheridan J. F., Pragnell I. B., Smithies O., 1995. Requirement of MIP-1α for an inflammatory response to viral infection. Science 269: 1583-1585.
40. Sozzani S., Sallusto F., Luini W., Zhou D., Piemonti L., Allavena P., Damme J. V., Valitutti S., Lanzavecchia A., Mantovani A., 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. J. Immunol. 155: 3292-3295.
41. Nakamura K., Williams I. R., Kupper T. S., 1995. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): Analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritc and Langerhans cells to skin. J. Invest. Dermatol. 105: 635-643.
42. Buelens C., Verhasselt V., Groote D. De, Thielemans K., Goldman M., Willems F., 1997. Interleukin-10 prevents generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Eur. J. Immunol. 27: 756-762.
43. Ralph P., Nakoinz I., Sampson-Johannes A., Fong S., Lowe D., Min H.-Y., Lin L., 1991. Interleukin-10, T lymphocyte inhibitor for human blood cell production of interleukin-1 and tumor necrosis factor α. J. Immunol. 148: 808-814.
44. Wang P., Wu P., Siegel M. I., Egan R. W., Billah M. M., 1994. Interleukin-10 inhibits transcription of cytokine genes in human blood mononuclear cells. J. Immunol. 153: 811-817.

45. Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kämpgen E., Eibl B., Niederwieser D., Schuler G., 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with regard to clinical applicability. J. Immunol. Methods 196: 137-151.
46. Witmer-Pack M. D., Olivier W., Valinsky J., Schuler G., Steiman R. M., 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.
47. Ortner U., 1994. Modulation und Migration von Langerhans Zellen in vitro und in vivo.
48. Zanella M., 1995. Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten: Einfluß von pro-inflammatorischen Zytokinen und Bakterienprodukten auf die Migration von murinen Langerhanszellen.
49. Ortner U., Inaba K., Koch F., Heine M., Miwa M., Schuler G., Romani N., 1996. An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells. J. Immunol. Methods 193: 71-79.
50. Roake J. A., Rao A. S., Morris P. J., Larsen C. P., Hankins D. F., Austyn J. M., 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin-1. J. Exp. Med. 181: 2237-2247.
51. Fahey T. J., Tracey K. J., Tekamp-Olson P., Cousens L. S., Jones W. G., Shires G. T., Cerami A., Sherry B., 1992. Macrophage inflammatory protein-1 modulates macrophage function. J. Immunol. 148: 2764-2769.
52. De Waal Malefyt R., Abrahms J., Bennet B., Figdor C. G., DeVries J. E., 1991. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 74: 1209-1215.
53. Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M., 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.
54. Echtenacher B., Falk W., Männel D. N., Krammer P. H., 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. J. Immunol. 145: 3762-3766.
55. Koch N., Huemmerling G. J., 1982. Ia invariant chain detected on lymphocyte surfaces by monoclonal antibody. Nature 299: 644-646.
56. Koch F., Kämpgen E., Schuler G., Romani N., 1992. Effective enrichment of murine epidermale Langerhans cells by a modified (mismatched) panning technique. J. Invest. Dermatol. 99: 803-807.
57. Juhlin L., Shelley W. B., 1977. New staining techniques for the Langerhans cells. Acta Derm. Venereol. 57: 289-296.
58. Austyn J. M., Liddington M. I., MacPherson G. G., 1996. Dendritic cells: Migration in vivo. In Weir´s Handbook of Experimental Immunology, edition 5, Herzenberg L. A., Herzenberg L. A., Weir D. M., Blackwell C., editors. Blackwell Science. Chapter 162: 162.1-162.9.
59. Schuler G., Steinman R. M., 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. Exp. Med. 161: 526-546.
60. Kitano Y., Okada N., 1982. Seperation of the epidermal sheet by dispase. Br. J. Dermatol. 108: 555-560.

61. Rambukkana A., Pistoor F. H., Bos J. D., Kapsenberg M. L., Das P. K., 1996. Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture: Migration, modulation of cell surface molecules, and early expression of interleukin-1β protein. Lab. Invest. 74: 422-436.
62. Sallusto F., Lanzavecchia A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor α. J. Exp. Med. 179: 1109-1118.
63. Kind M., 1997. Die Zytokinexpression von dendritischen Zellen: Etablierung von zytokinspezifischen Elisas (enzyme linked immunosorbent assays) und Zytokinmessung in Kulturüberständen.
64. Senoo A., Imazeki N., Fuse Y., 1994. Ultrastructural and immunohistochemical studies on mice skin and lymph nodes after treatment of tumor necrosis factor alpha. Dendritic cells 4: 151-157.
65. Groves R. W., Allen M. H., Ross E. L., Barker J. N. W. N., MacDonald D. M., 1994. Tumor necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. Br. J. Dermatol. 132: 345-352.
66. Cumberbatch M., Kimber J., 1995. Tumor necrosis factor-α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. Immunol. 84: 31-35.
67. Piguet P. F., Grau G. E., Hauser C., Vassalli P., 1991. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensivity reactions. J. Exp. Med. 173: 673-679.
68. Nylander-Lundqvist E., Bäck O., 1990. Interleukin-1 decreases the number of Ia^+ epidermal dendritic cells but increases the expression of Ia^+-antigen. Acta Derm. Venereol. 70: 391-394.
69. Enk A. H., Katz S. I., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1398-1402.
70. Verhasselt V., Buelens C., Willems F., Groote D. De, Haeffner-Cavaillon N., Goldman M., 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells. J. Immunol. 158: 2919-2925.
71. Kondo S., Wang B. H., Fujisawa H., Shivji G. M., Echtenachter B., Mak T. W., Sauder D. N., 1995. Effect of gene-targeted mutation in TNF receptor (p55) on contact hypersensivity and ultraviolet B-induced immunosupression. J. Immunol. 155: 3801-3805.
72. Wang B., Kondo S., Shivji G. M., Fujisawa H., Mak T. W., Sauder D. N., 1996. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans´cells. Immunol. 88: 284-288.
73. Fantuzzi G., Zheng H., Faggioni R., Benigni F., Ghezzi P., Sipe J. D., Shaw A. R., Dinarello C. A., 1996. Effect of endotoxin in IL-1β-deficient mice. J. Immunol. 157: 291-296.
74. Shornick L. P., De Togni P., Mariathasan S., Goellner J., Strauss-Schoenberger J., Karr R. W., Fergueson T. A., Chaplin D. D., 1996. Mice deficient in IL-1β manifest impaired contact hypersensivity to trinitrochlorobenzene. J. Exp. Med. 183: 1427-1436.
75. Kondo S., Pastore S., Fujisawa H., Shivji G. M., McKenzie R. C., Dinarello C. A., Sauder D. N., 1995: Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensivity. J. Invest. Dermatol. 105: 334-338.
76. Roake J. A., Rao A. S., Morris P. J., Larsen C. P., Hankins D. F., Austyn J. M., 1995. Systemic lipopolysaccharide recruits dendritic cells progenitors to nonlymphoid tissues. Transplantation 59: 1319-1324.

77. Xu L. L., Warren M. K., Rose W. L., Gong W., Wang J. M., 1996. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other c-c-chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. J. Leukoc. Biol. 60: 365-371.
78. Caux C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D., Banchereau J., 1992. GM-CSF and TNFα cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature 360: 258-261.
79. Rupec R., Magerstaedt R., Schirren C. G., Sander E., Bieber T., 1996. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces the migration of human epidermal Langerhans cells in vitro. Exp. Dermatol. 5 (2): 115-119.
80. O´Sullivan G. M., Sluyter R., Boswell C. M., Barnetson R. S., Halliday G. M., 1996. Modulation of Ia^+ Langerhans cell numbers in vivo by cultured epidermis derived supernatants and by GM-CSF. Exp. Dermatol. 5 (1): 28-37.
81. Blauvelt A. S., Katz S. I., Udey M. C., 1995. Human Langerhans cells express E-cadherin. J. Invest. Dermatol. 194: 293-296.
82. Schwarzenberg K., Udey M. C., 1996. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. J. Invest. Dermatol. 106: 553-558.
83. Koch F., Trockenbacher B., Kämpgen E., Grauer O., Stössel H., Livingstone A. M., Schuler G., Romani N., 1995. Antigen processing in populations of mature dendritic cells is caused by subsets of incompletely matured cells. J. Immunol. 155: 93-100.

Universitäts-Bibliothek • Innsbruck