

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo

Ortner, Ulrike

1994

III. Das Organkultursystem

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12523](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12523)

III. Das Organkultursystem

1.) Einleitung:

Ist das Organkultursystem für Studien der Migration geeignet?

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

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

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

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

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

2.)Fragestellung:

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

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

3.)Versuche/Ergebnisse:

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

Morphologische Veränderungen der epidermalen LZ in situ

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

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

Ergebnis:

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

Es erfolgte eine quantitative Auswertung der LZ-Zahl/mm² (siehe Tab.III.1) durch randomisierte Auszählung von mindestens 9 Gesichtsfeldern je „sheet“ mittels eines im Okular integrierten Zählfeldes. Damit kann eine kontinuierliche Abnahme der LZ-Zahl quantitativ beschrieben werden. Es wurden mindestens 3 „sheets“ (und dort jeweils 9 Gesichtsfelder) pro Tagesfraktion ausgezählt.

Tab III.1

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

Legende:

Mittelwert: Errechnete Durchschnittswert aus 3 ausgezählten „sheets“ je 9 Gesichtsfelder umgerechnet auf Zellzahl pro mm².

Std.Abw.: Standardabweichung

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

3.2 Akkumulation der DZ in der Dermis:

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

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

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

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

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

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

3.3 Ins Kulturmedium ausgewanderte Zellen

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

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

Balb/c			
	Ges.¹	DZ²	%DZ³
Exp. 1	38.400	14.700	38
Exp. 2	34.900	12.000	34
Exp. 3	48.000	11.900	25
Exp. 4	36.100	11.700	32
Exp. 5	56.300	15.800	28
Exp. 6	31.700	12.200	38
Exp. 7	31.200	10.700	34
Exp. 8	50.900	16.100	32
Exp. 9	27.300	7.000	26
Exp. 10	28.900	7.000	24
Durchschnitt	38.370	11.910	31

C3H			
	Ges.	DZ	%DZ
Exp. 1	17.900	6.200	35

Legende:

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

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

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

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

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

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

3.4 Morphologische und phänotypische Charakteristika der ausgewanderten Zellen

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

3.5 Funktionelle Eigenschaften der DZ

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

3.6 Modifikation des Organkultursystems

a) Das modifizierte System:

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

Hierbei kamen einige interessante Aspekte zum Vorschein:

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

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

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

Tab.III.4:

Anreicherung der DZ im Verlauf der neuen Organkultur

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

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

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

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

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

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

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

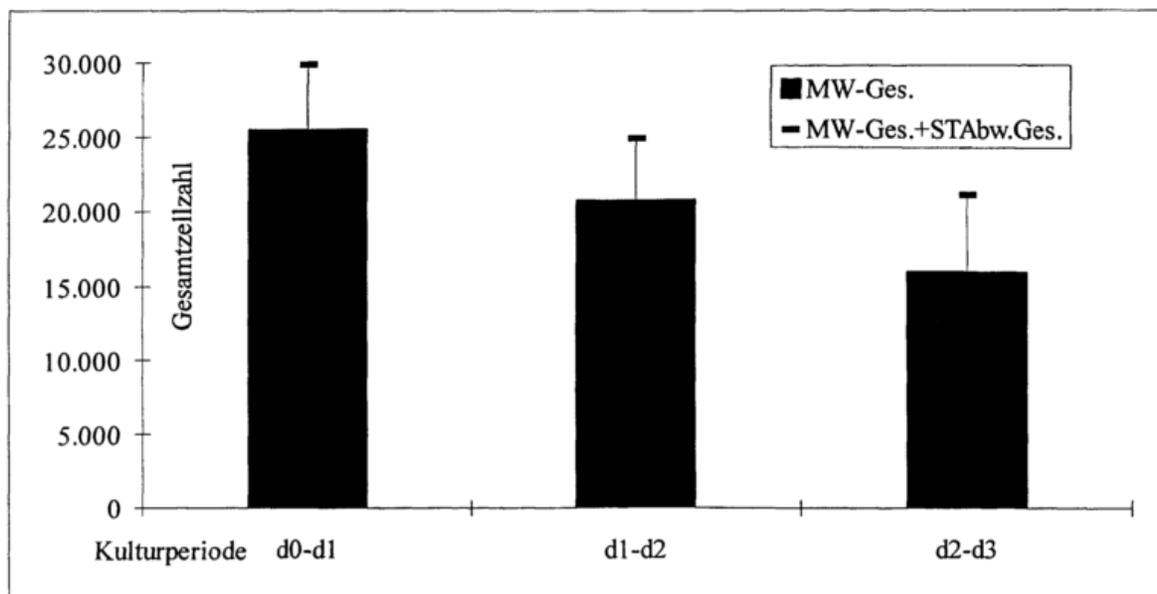
C3H				
		Ges.	DZ	%DZ
Exp. 8	d0-d1	8.600	4.400	51
	d1-d2	10.100	5.700	56
	d2-d3	9.400	5.700	61

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

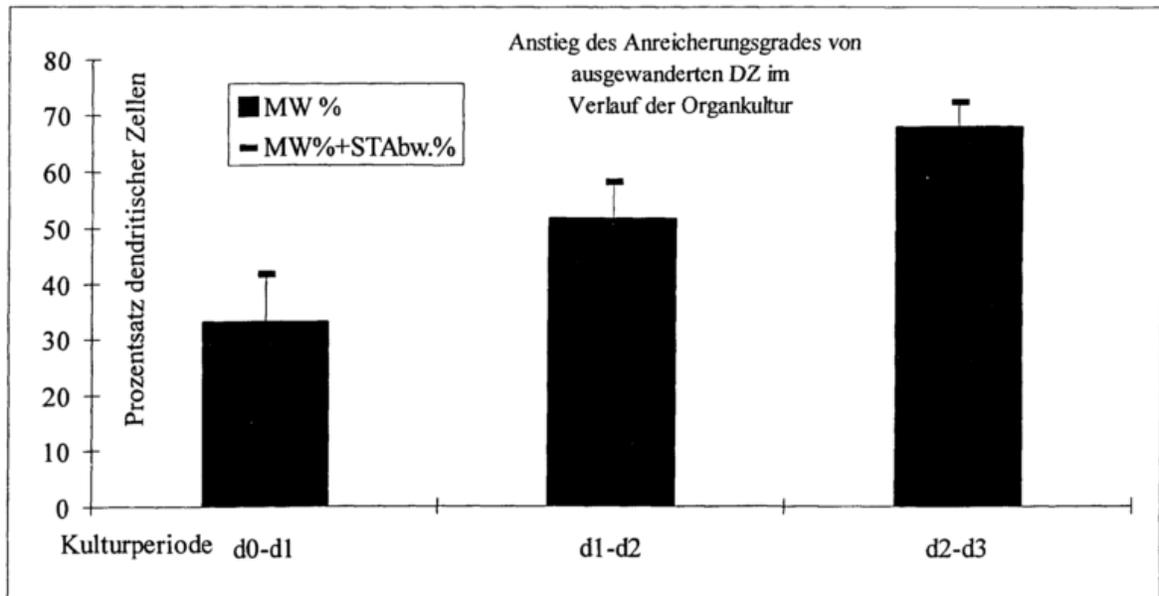
Legende: d0-d1: entspricht den von Tag0-Tag1 ausgewanderten Zellen
d1-d2: entspricht den von Tag1-Tag2 ausgewanderten Zellen
d2-d3: entspricht den von Tag2-Tag3 ausgewanderten Zellen
Ges.: Gesamtzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten Zellen.
DZ : Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ
%DZ: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

Graphik III.1:

Graphische Darstellung der Verhältnisse der Gesamtzahlen im Verlauf der Organkultur



Graphik III.2:



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

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

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

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

b) Verhalten der Auswanderung in einem verlängerten Zeitraum

Tab.III.5

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

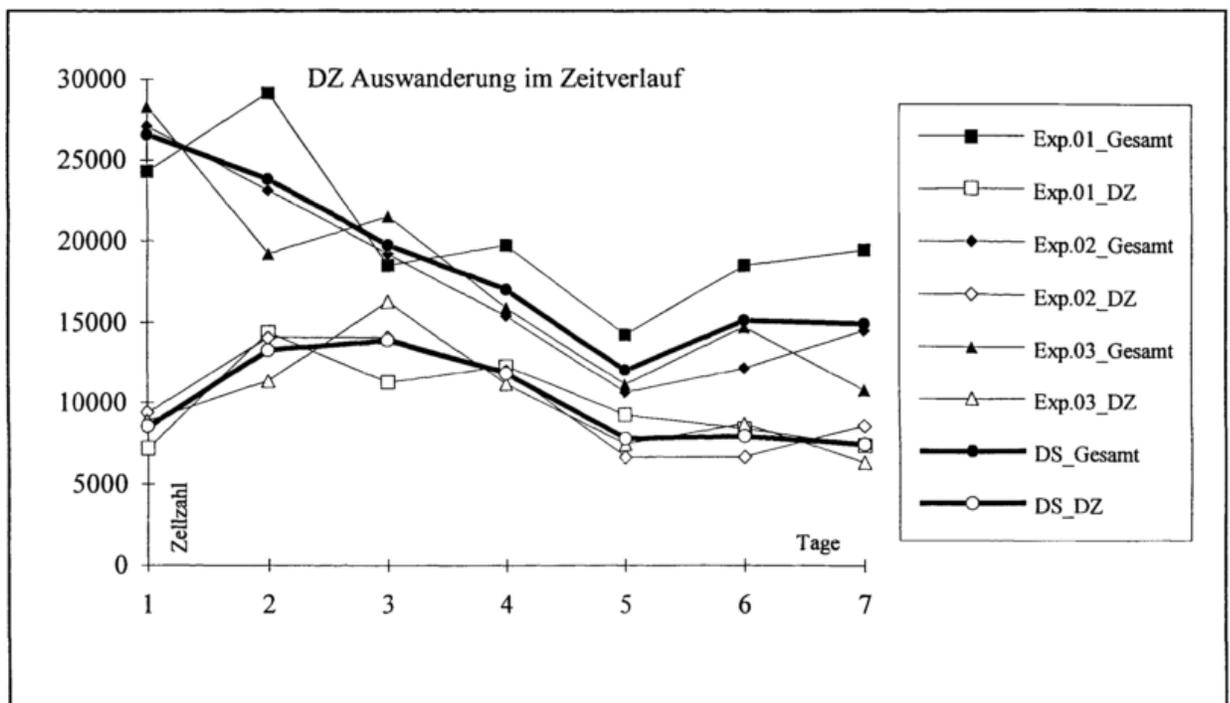
Zeitverlauf				
		Ges.	DZ	%DZ
Exp. 2	d0-d1	27.100	9.400	35
	d1-d2	23.100	14.100	61
	d2-d3	19.200	14.100	73
	d3-d4	15.400	12.000	78
	d4-d5	10.700	6.700	63
	d5-d6	12.100	6.700	55
	d6-d7	14.500	8.600	59
	d7-d8	11.100	4.800	43
	d8-d9	10.300	4.900	48
	d9-d10	15.400	3.700	24
	d10-d11	15.000	2.900	19
	d11-d13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

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

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

Graphik III.3:

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



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

c) Entwicklung und Reifung kutaner DZ während der Organkultur

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

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

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

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

Tab.III.6:

Entwicklung/Reifung der immunstimulatorischen Kapazität kutaner DZ während der Organkultur

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

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

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

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

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

Tab.III.7:

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

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

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

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

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

4.)Diskussion:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Abbildung: 1

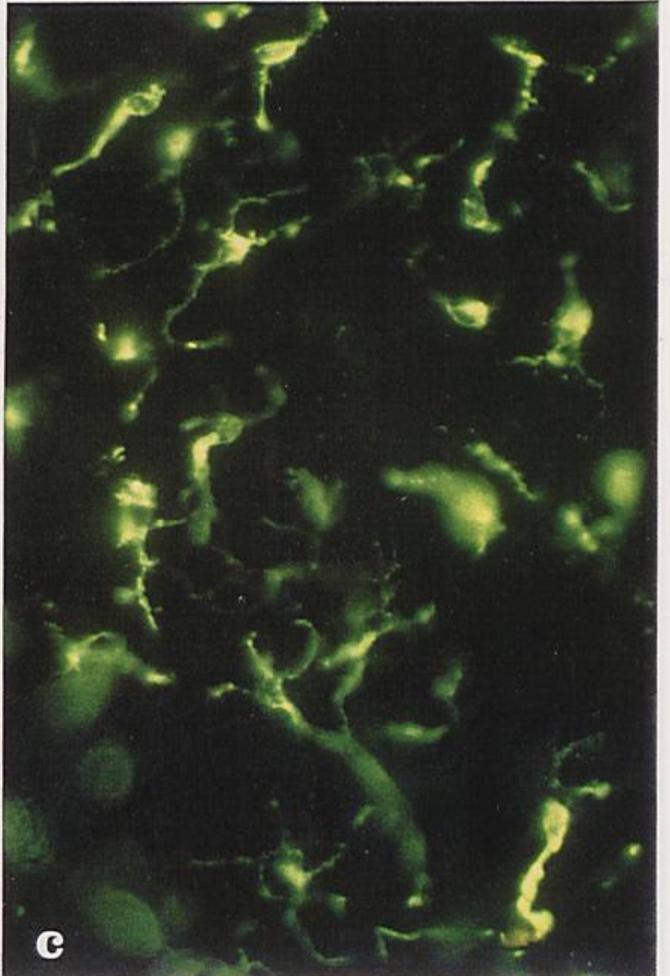
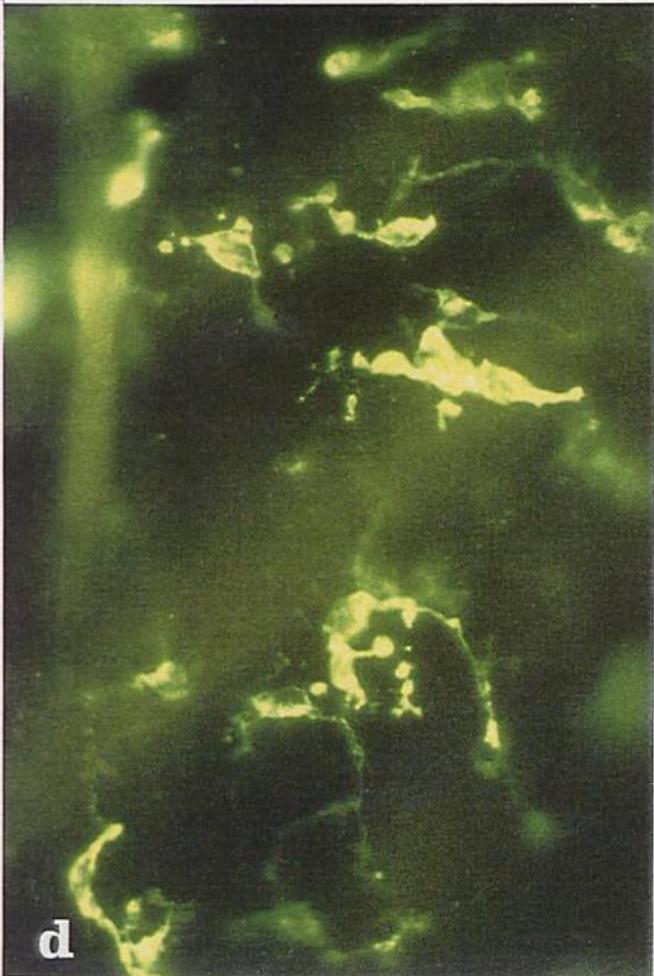
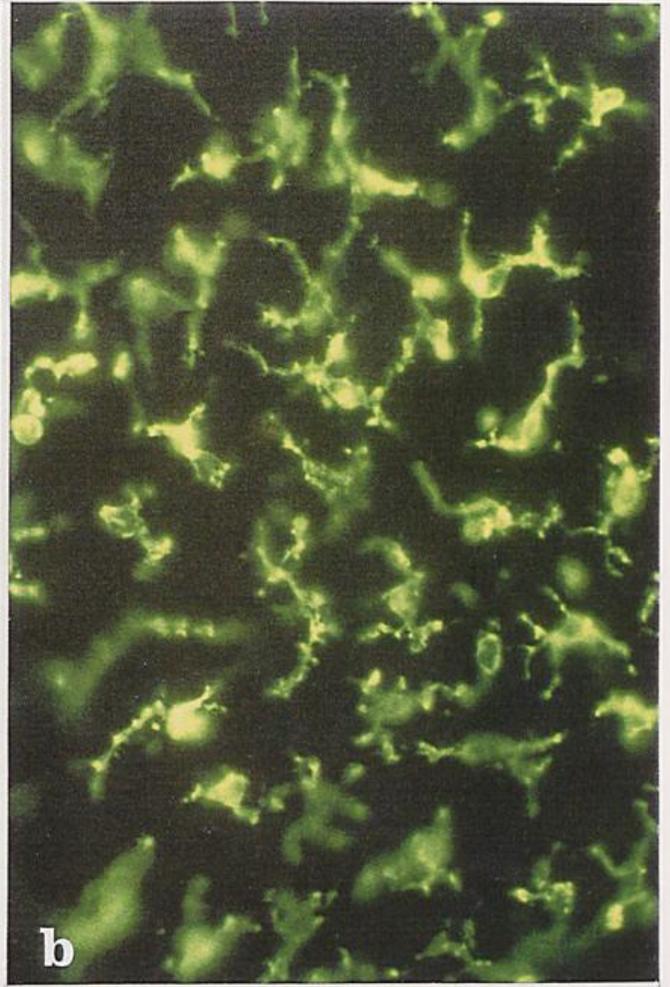
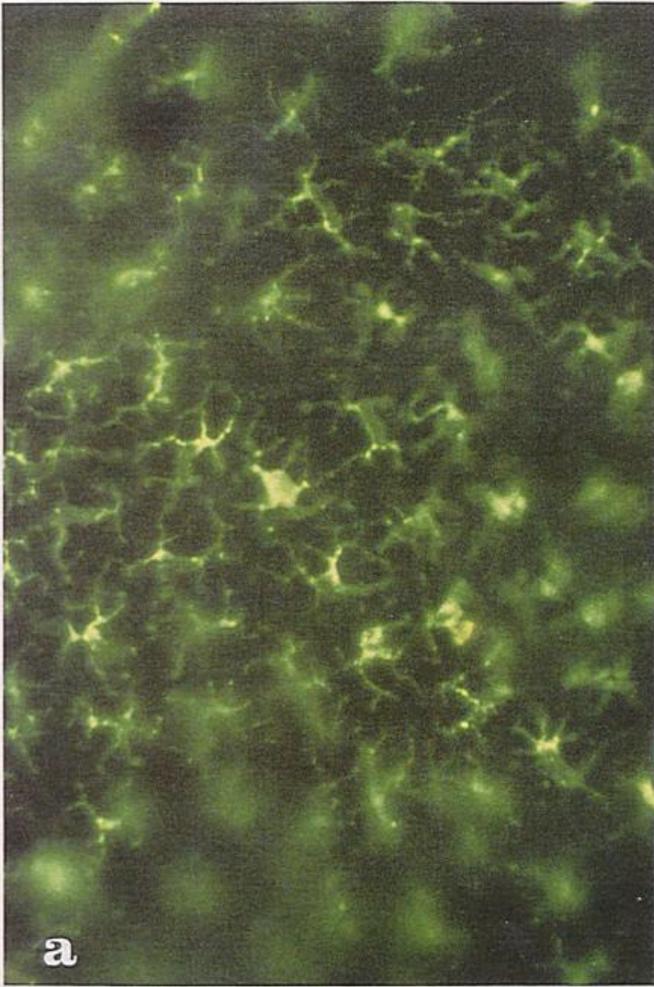


Abbildung: 2

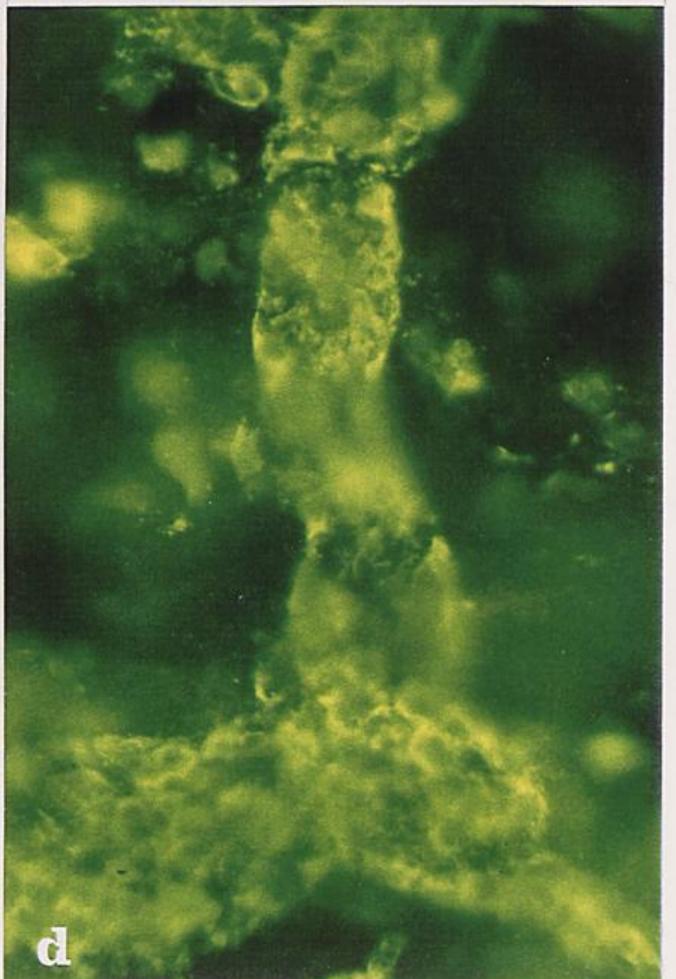
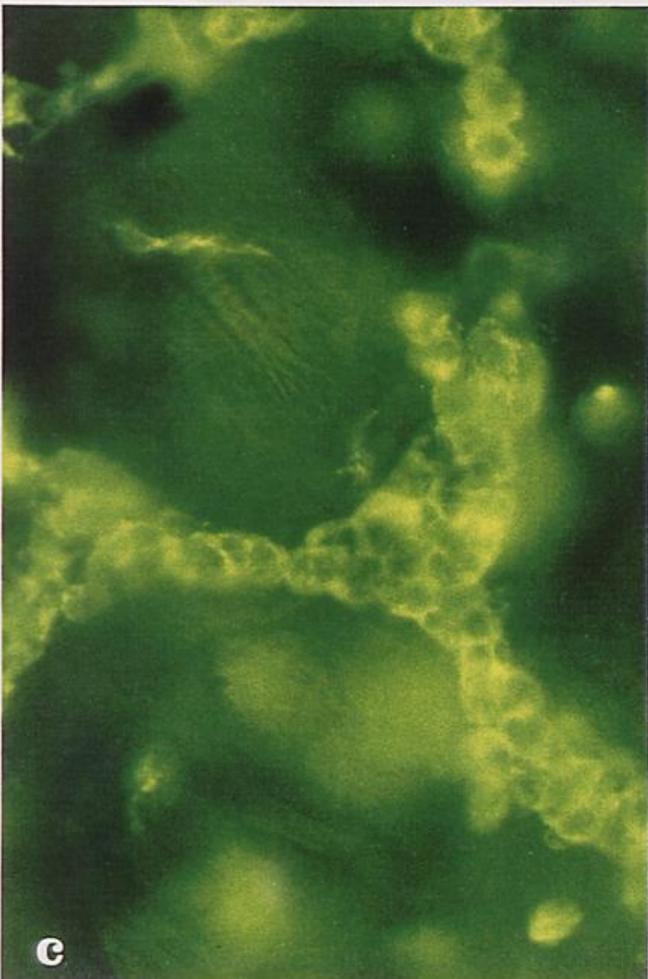
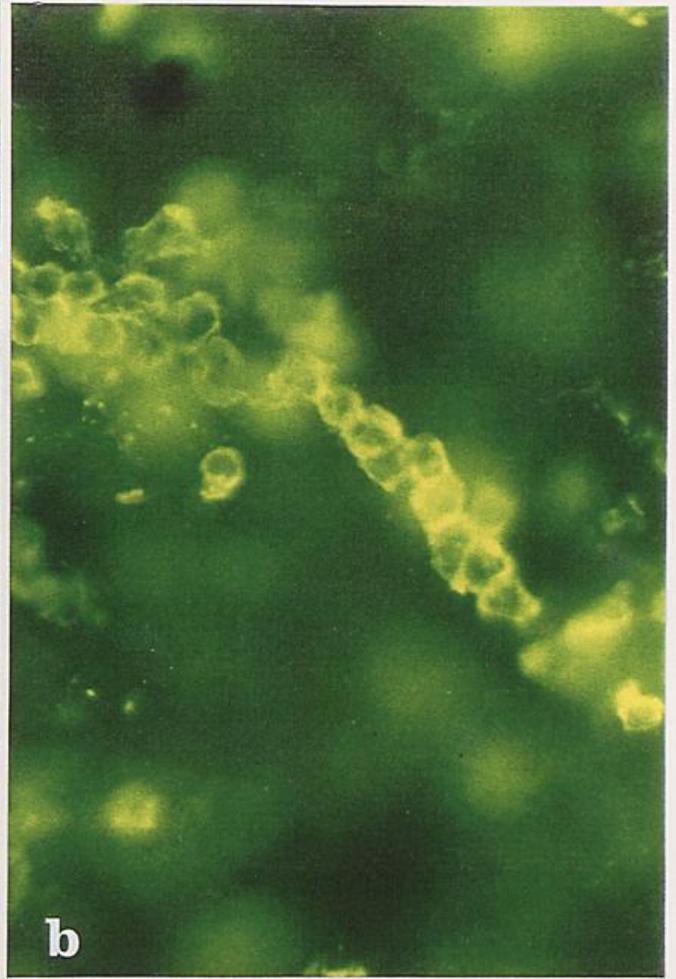
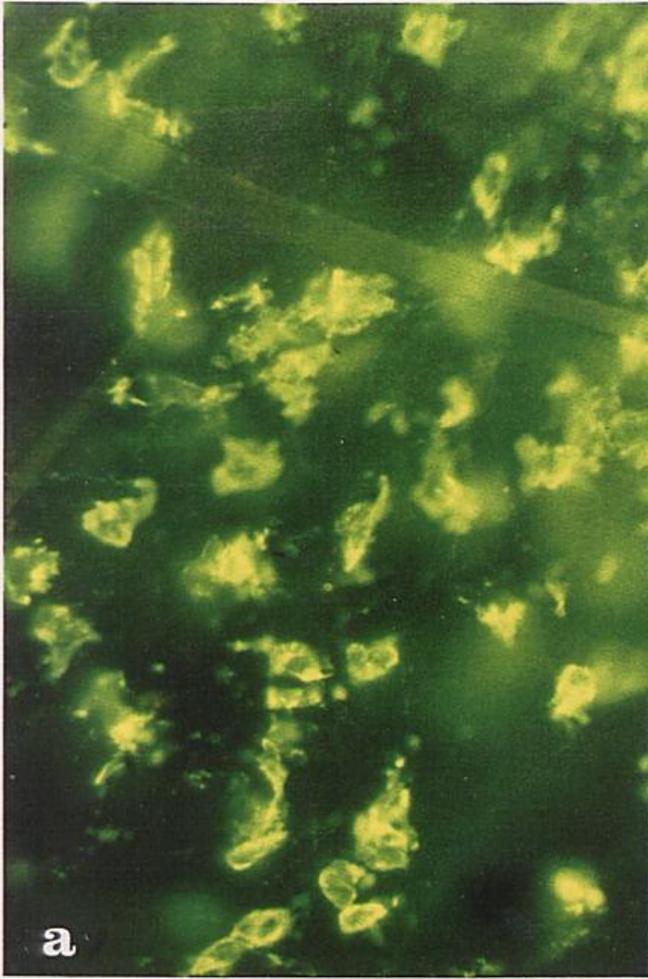


Abbildung: 3

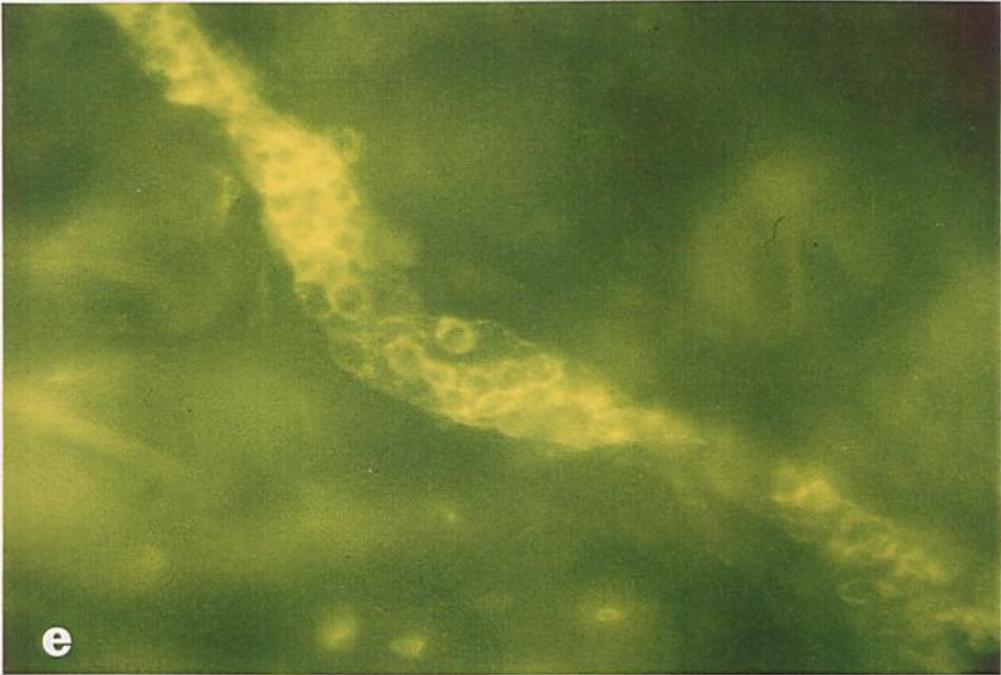
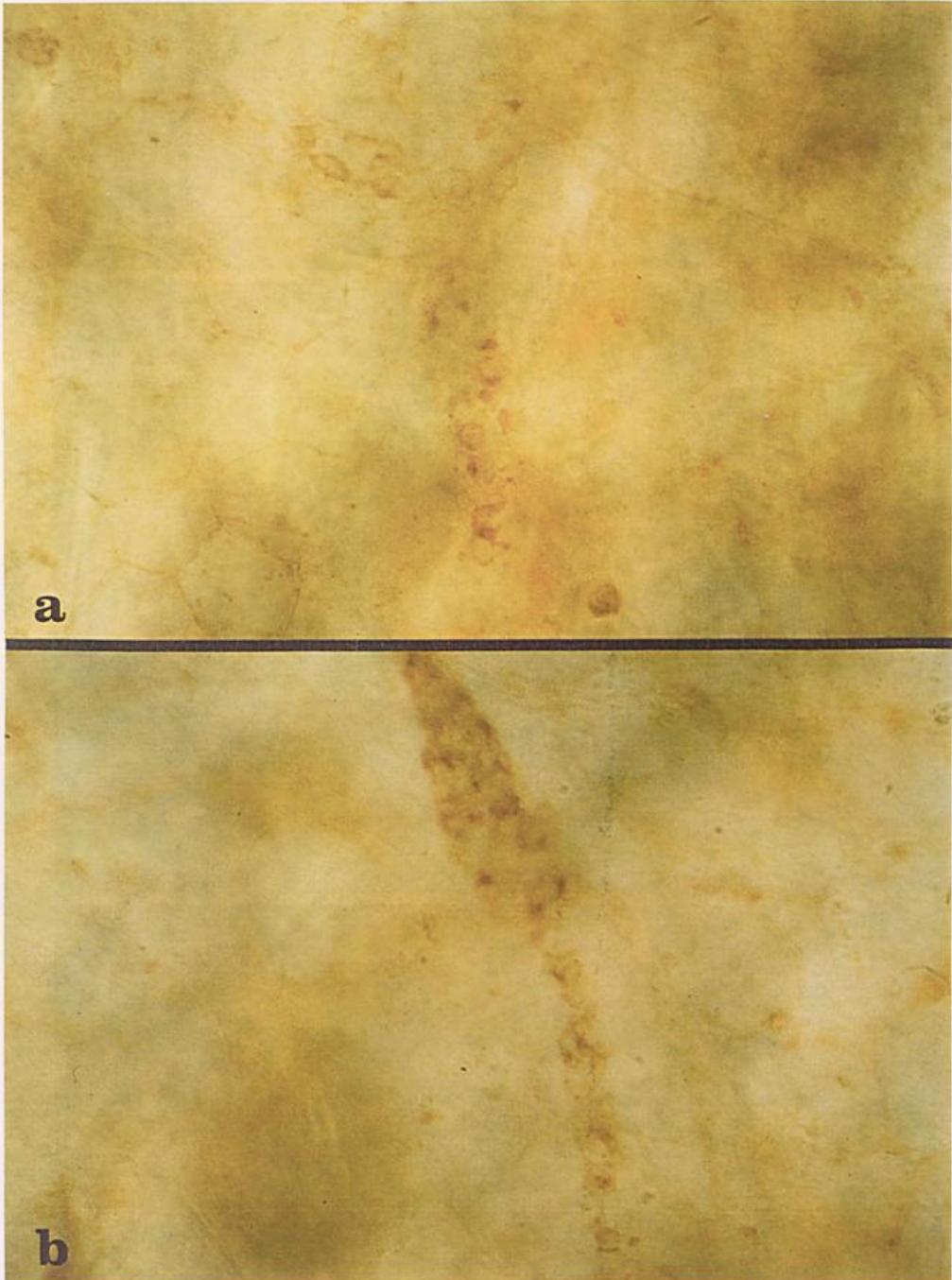
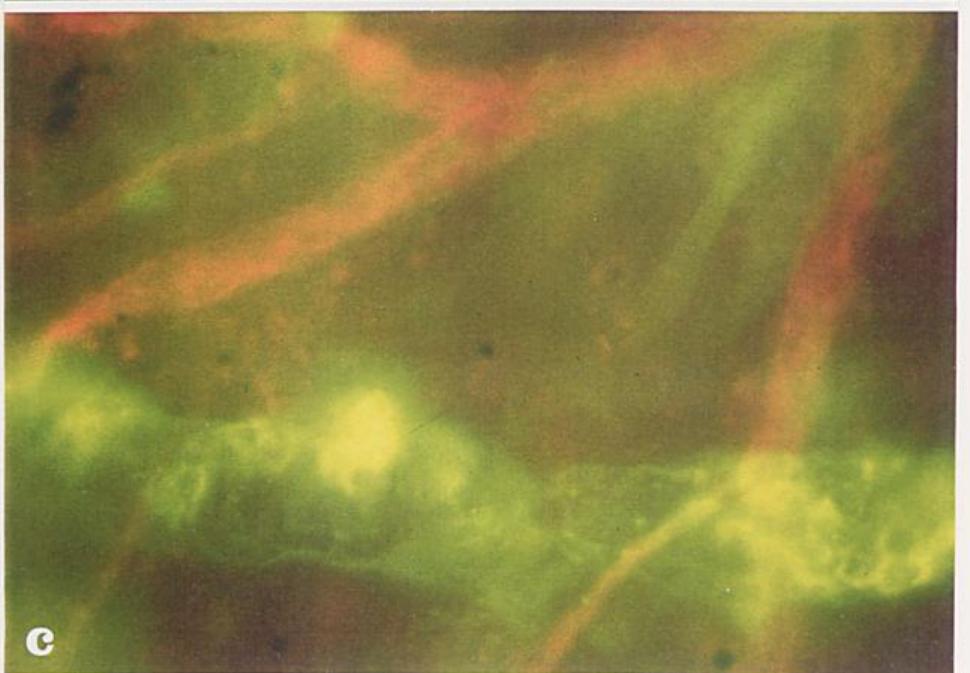
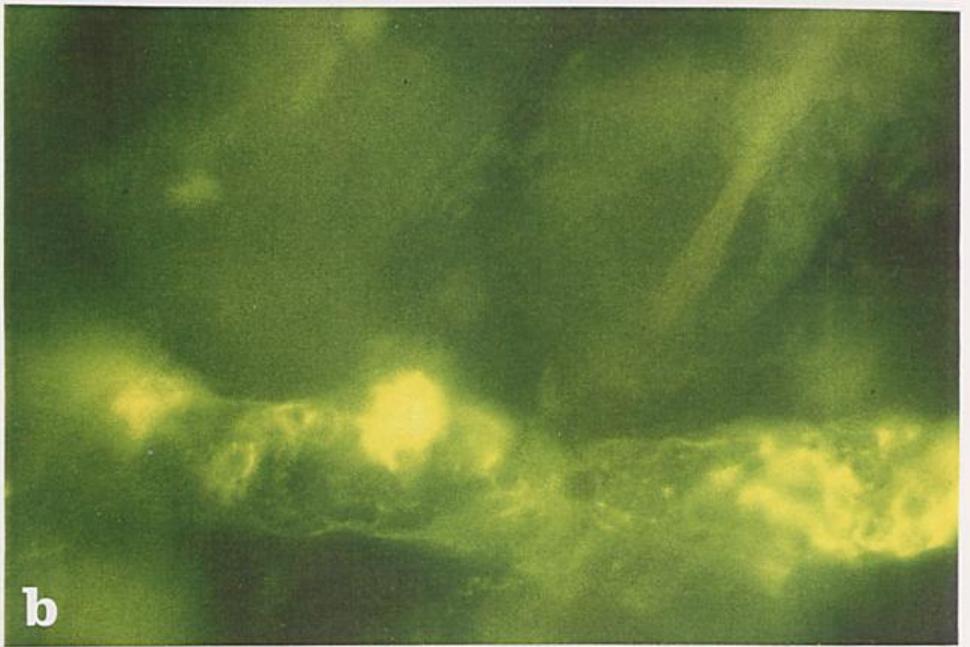
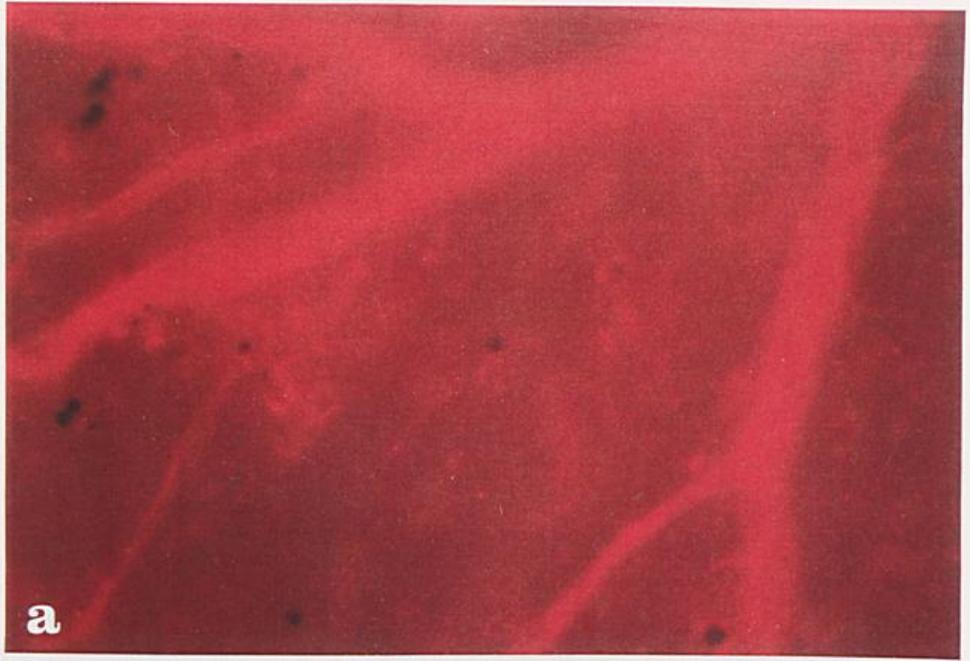


Abbildung: 4





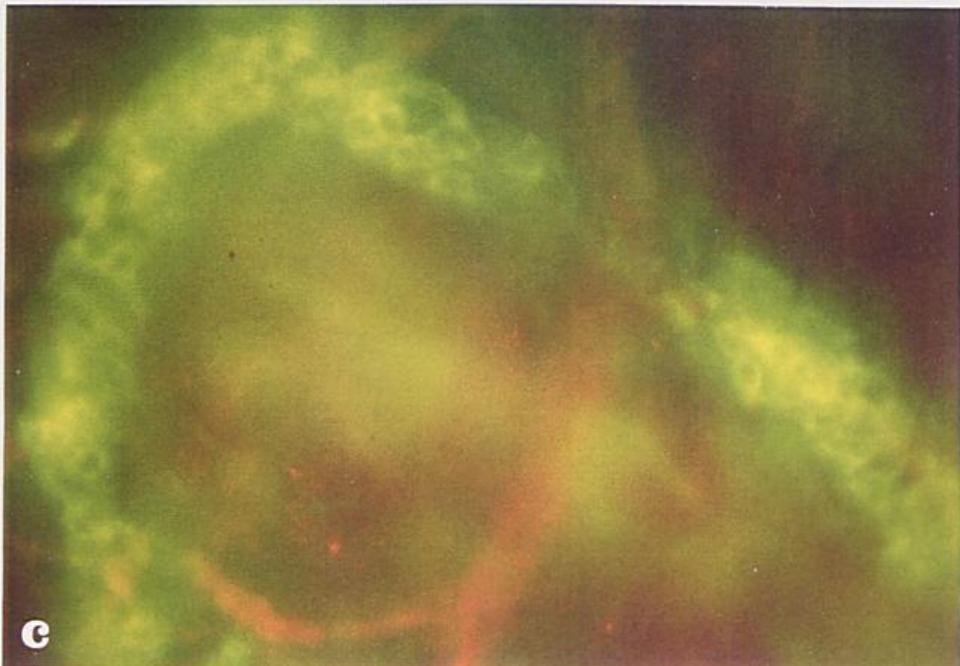
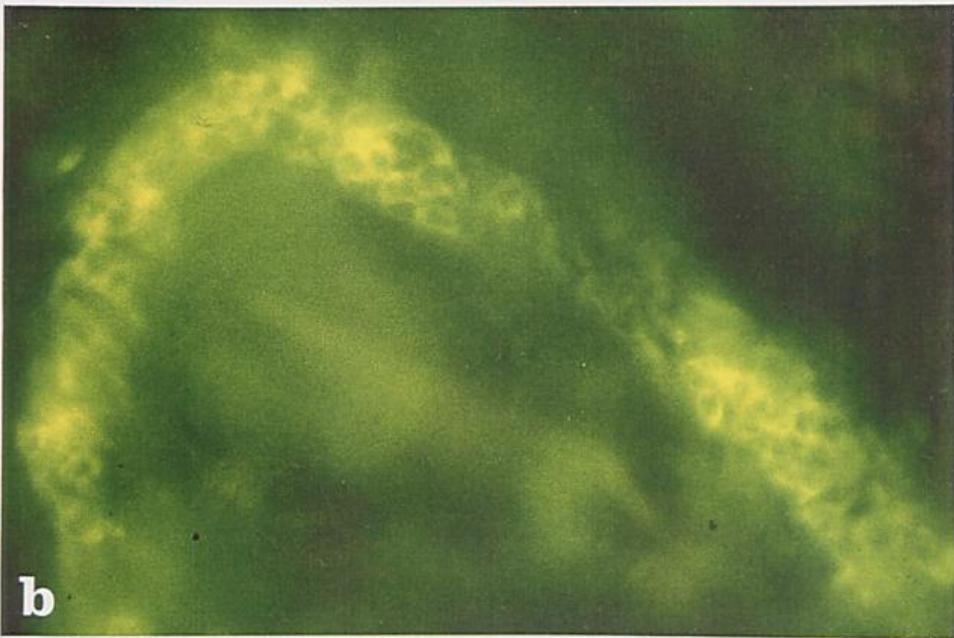


Abbildung: 7

