

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo

Ortner, Ulrike

1994

IV. Mechanismen der Migration

IV. Mechanismen der Migration

1.) Einleitung:

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

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

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

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

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

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

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

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

2.)Fragestellung:

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

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

3.) Versuche/Ergebnisse:

3.1: Unterschiedliche Versuchsansätze mit Zugabe von Zytokinen:

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

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

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

Tab.IV.1

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

Balb/c			
		Ges.	DZ
Exp. 2	R10	28.900	6.400
	TNF- α 1000 U/ml	31.200	8.300
	TNF- α 32000 U/ml	20.700	5.400
	GM-CSF 2000 U/ml	28.400	7.600

Balb/c			
		Ges.	DZ
Exp. 3	R10	26.200	11.700
	TNF- α 2500 U/ml	26.400	8.500

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

Balb/c			
		Ges.	DZ
Exp. 5	R10	31.200	11.600
	IL-1 β 20 U/ml	32.600	10.400

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

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

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

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

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

Tab.IV.2

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

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

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

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

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

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

Tab.VI.3:

Austestung der serumfreien Medien im modifizierten System:

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

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

Tab.IV.4:

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

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

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

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

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

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

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

Tab.IV.5:

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

C3H-Mäuse im klassischen System				
			Ges.	DZ
Exp. 1	R10	d3	17.900	6.300
	TNF- α 1000 U/ml	d3	11.300	5.900
	GM-CSF 1000 U/ml	d3	21.400	7.400

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

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

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

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

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

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

Tab.IV.6:

LPS-resistente Mäuse versus normale C3H-Mäuse:

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

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

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

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

c) Das „getriggerte“ Sytem:

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

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

Tab.IV.7:

28 Stunden Triggerzeit ¹				
			Ges.	DZ
Exp. 1	R10	d0-d2	26.600	6.200
	R10	d0-d2	27.400	6.300
	TNF- α 1500 U/ml	d0-d2	35.200	13.200

25 Stunden Triggerzeit¹				
			Ges.	DZ
Exp. 2	R10	d0-d2	36.100	6.200
	TNF α 1000 U/ml	d0-d2	35.600	9.100
	GM-CSF 1000 U/ml	d0-d2	32.200	8.900
	SN 10^{-6} U/ml	d0-d2	44.400	10.600
	IL-1 20 U/ml	d0-d2	43.300	11.700
	IL-1 + GM-CSF	d0-d2	47.400	12.400
	IL-1 β 20 U/ml	d0-d2	31.600	8.700
	IL-1 β + GM-CSF	d0-d2	36.600	9.600

30 Stunden Triggerzeit¹				
			Ges.	DZ
Exp. 3	R10	d0-d2	24.000	5.200
	TNF- α 1000 U/ml	d0-d2	48.900	13.000
	GM-CSF 750 U/ml	d0-d2	41.000	12.100
	SN 10^{-6} molar	d0-d2	36.100	10.000

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

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

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

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

3.2 Verschiedene Versuchsansätze mit Antizytokinen

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

a) Zugabe von Anti-TNF- α :

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

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

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

Tab.IV.8:

Anti-TNF- α 1F3F3:

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

Klassisches System					
			Ges.	DZ	
Exp. 2	R10	d0-d3	27.300	11.400	
	TNF- α 1000 U/ml	d0-d3	39.400	15.100	
	1F3F3 3000 U/ml	d0-d3	28.800	10.900	

Klassisches System				
			Ges.	DZ
Exp. 3	R10	d0-d3	28.900	10.700
	TNF- α 1000 U/ml	d0-d3	31.200	12.100
	1F3F3 9000 U/ml	d0-d3	40.100	13.200

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

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

%DZ: Prozentueller Anteil der DZ an der Gesamtzellzahl

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

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

Anti-TNF- α V1q:

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

Tab.IV.9:

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

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

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

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

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

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

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

Tab.IV.10:Austestung weiterer Anti-TNF- α :

Klassisches System				
			Ges.	DZ
Exp. 1	R10	d3	40.900	12.100
	Anti -TNF- α 1000 U/ml Genzyme 20ng/ml	d3	34.000	8.200
	Anti -TNF- α Vasalli 70 μ l	d3	20.400	700
	Anti -TNF- α Lemanian 1700 U/ml	d3	42.200	11.800

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

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

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

Toxizitätstest für Anti-TNF- α V1q und Vasalli:

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

Je 2 well versehen mit: reinem Medium R 10

je 2 well mit 500 U/ml GM-CSF

je 2 well mit 16.000 U/ml V1q

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

je 2 well mit 40 μ l/ml Anti-TNF- α Vasalli

je 2 well mit 40 μ l/ml Anti-TNF- α Vasalli + GM-CSF

je 2 well mit dem Überstand aus der Organkultur

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

Ansätze zum besseren Eindringen der Antikörper ins Gewebe

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

Das prinzipielle Eindringen hochmolekularer Substanzen bewies ich mit dem Auflegen einer Ohrhälfte auf ein Medium/Antikörper-Gemisch (Klasse II-Antikörper B21/2, 1:1 Gemisch) für einen Tag unter gleichen Bedingungen wie die Organkultur (37°C, 5% CO₂). Nach Anfertigung von „sheets“ aus dieser Ohrhälfte und Färbung derselbigen nur mit den Sekundärreagenzien (biotinylierter anti-Ratten-Ig-Antikörper und Streptavidin FITC-Konjugat), konnte eine eindeutige Anfärbung der DZ sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis beobachtet werden (Abb.10). Dieser Befund bewies zwar, daß Antikörper (d.h. ca.150.000 D Molekulargewicht) in das Organ eindringen können, doch die Geschwindigkeit dieses Vorganges ist damit noch unklar. Um den im Medium befindlichen Antikörpern die Möglichkeit zu geben, durch Diffusion an den Wirkort zu gelangen bevor die Migration voll in Gang gesetzt wurde, wurden die Organkulturen für einige Stunden (2-3 h) in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Hierdurch sollte die Migration vorübergehend gehemmt werden, während die Diffusion des Antikörpers durchaus stattfinden konnte (siehe Tab. IV.11). Für diese Experimente wurde der kommerzielle neutralisierende Anti-murin TNF Antikörper von Innogenetics verwendet.

Tab.IV.11:

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

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

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

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

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

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

b) Zugabe von Anti-IL-1 β (Goat-anti-mouse IL-1 β , Genzyme)

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

Tab.IV.12:

C3H-Mäuse im klassischen System				
			Ges.	DZ
Exp. 1	R10	d2	31.200	11.600
	IL-1 β 20 U/ml	d2	32.600	11.400
	Anti IL-1 β 20 μ g/ml	d2	34.400	11.100

C3H-Mäuse im klassischen System				
			Ges.	DZ
Exp. 2	R10	d2	29.500	13.100
	Anti IL-1 β 20 μ g/ml	d2	22.000	9.500

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

DZ: Anzahl der in diesem Zeitraum ausgewanderten DZ

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

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

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

3.3 Ein *in vivo/in vitro* Kombinationssystem

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

a) Spezielle Methodik:

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

- murines Interleukin-1β 30ng (Genzyme Corp., Cambridge, MA) in 50µl sterilem PBS verdünnt
- Anti-murines Interleukin-1β 20µl (1mg/ml Endkonzentration) (Genzyme) in 50µl sterilem PBS. Diese hohe Dosierung begründet sich aus dem Wissen, daß große Mengen von Interleukin-1β in den DZ exprimiert werden [95, 129, 130].
- murines Interleukin-1α 30ng (Genzyme) in 50µl sterilem PBS/Ohr
- Anti-murines Interleukin-1α 20µl (1mg/ml) (Genzyme) in 50µl sterilem PBS
- muriner TNF-α 1000 U oder 500 U/Ohr/50µl sterilem PBS
- humaner TNF-α (von Dr. GR Adolph, Bender Ges.m.b.H, Wien; 4x10⁷ U/mg spezifische Aktivität) 500 U/Ohr/50µl sterilem PBS
- muriner GM-CSF 1000 U/Ohr/50µl sterilem PBS

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

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

b) Versuche/Ergebnisse:

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

Tab.IV.13:

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

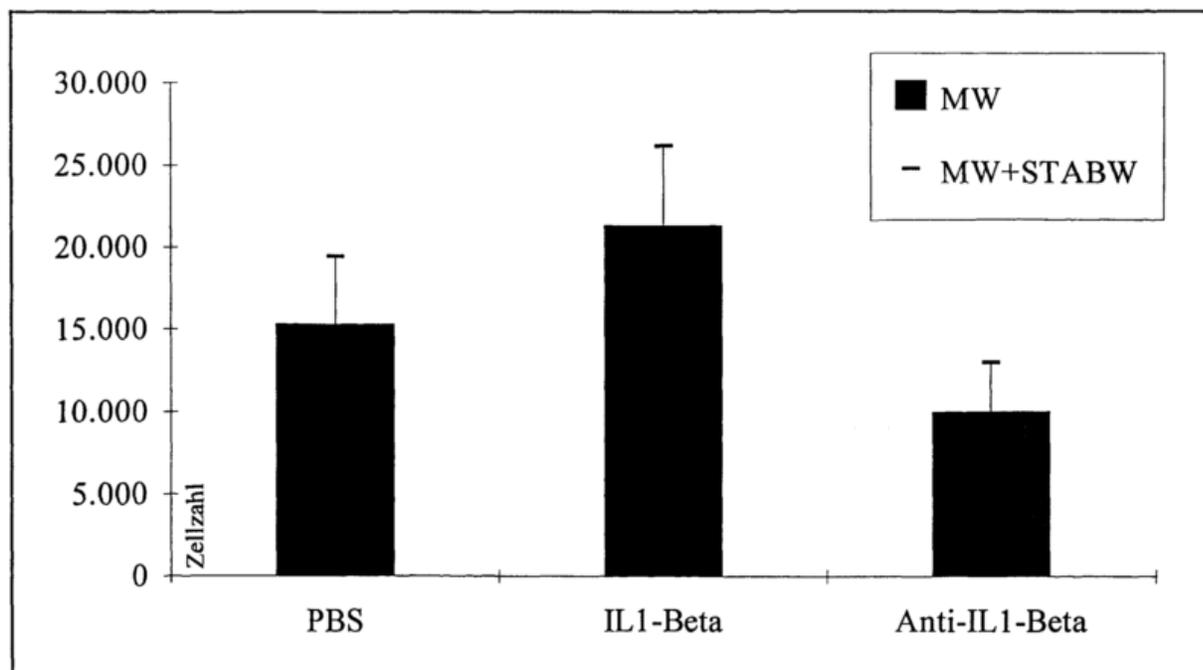
Balb/c				
Exp.2	intradermale Injektion	Kulturdauer	Ges.	DZ
	IL-1 β 30ng	18h	49.000	16.400
	Anti-IL-1 β 20 μ l	18h	35.600	6.000
	PBS-Kontrolle	18h	38.200	10.000
	TNF- α 1000 U/Ohr	18h	40.600	14.300
	GM-CSF 1000 U/Ohr	18h	48.300	11.900
	PBS-Kontrolle	18h	37.900	11.300

Balb/c				
Exp.3	intradermale Injektion	Kulturdauer	Ges.	DZ
	IL-1 β 30ng	18h	80.600	19.900
	Anti-IL-1 β 20 μ l	18h	67.800	12.000
	PBS-Kontrolle	18h	80.100	16.000
	IL-1 α 30ng	18h	26.200	10.600
	Anti-IL-1 α 20 μ l	18h	29.400	12.600
	PBS-Kontrolle	18h	27.200	9.500

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

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

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

Graphik VI.1:Darstellung der Wirksamkeit der gespritzten Zytokine:

Legende: MW: Mittelwert
STABW: Standardabweichung

Tab.IV.14:Vergleichsversuch mit und ohne Zugabe der Zytokine zur Kultur

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tab.IV.15:

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

Legende: Mittelwert: Der aus den Zählergebnissen aus 10 Zählfeldern errechnete Durchschnittswert
Standardabweichung: Variationsbreite dieser 10 Zählfelder

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

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

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

Tab. VI.16:

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

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

4.)Diskussion:

Methodische Ansätze zum Studium der Migration von dendritischen Zellen.

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

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

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

Die Rolle der Zytokine bei der Migration von dendritischen Zellen.

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

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

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

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

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

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

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

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

Die Rolle anderer Faktoren bei der Migration von dendritischen Zellen.

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

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

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

Klinische Relevanz von Migrationsstudien.

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

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

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

V. TNE-alpha Zytotoxizitätsassay

Abbildung: 10

