universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Charakteristische Aspekte des Migrationsverhaltens kutaner dendritischer Zellen im Humansystem

Lukas, Michael Alexander

1996

II. Material & Methodik

urn:nbn:at:at-ubi:2-12531

II. MATERIAL & METHODIK

1. KULTURMEDIUM

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

2. PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

292 g NaCl sowie *69 g* $NaH_2PO_4 \times H_2O$ wurden in *5000 ml Acqua dest.* gelöst und der *pH-Wert* mittels 1 normaler HCl auf *6.9* eingestellt.
Für die experimentelle Verwendung wurde die so entstandene Stammlösung in der Folge *1 : 10 in Acqua dest.* verdünnt.

3. PHOSPHATPUFFER

8.9 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ wurden *in 500 ml Acqua dest.* gelöst. Diese 0.1 molare Lösung hat einen *pH-Wert* von etwa *9.2*. Durch allmähliche Zugabe 0.1 m KH_2PO_4 (i.e. 6.8 g in 500 ml Acqua dest.) wird der pH schließlich auf 6.8 gedrückt. Ergebnis ist ein 0.1 m Na-K-Puffer mit pH 6.8.

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

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

5. HUMANE HAUT

Ausgangspunkt sämtlicher Experimente waren Exzidate *gesunder humaner Haut*, die im Rahmen elektiver korrektiv-plastisch chirurgischer Maßnahmen anfielen und mir in freundlicher Weise von der Univ.-Klinik für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie Innsbruck sowie von der entsprechenden Abteilung am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Salzburg (OA Dr. Ludwig Hefel) zur Verfügung gestellt wurden.
Hauptquelle dieser Hautproben waren *Mammareduktionsplastiken*, vor allem des häufigeren Vorkommens wegen, aber auch aufgrund des Erhalts ausreichender Menge qualitativ akzeptabler Haut. Die kontinuierliche Verwendung gerade dieser Haut sollte zudem auch die Möglichkeit der "transversalen Vergleichbarkeit" der experimentell erhobenen Befunde eröffnen. In einigen Fällen wurde auf *abdominelle Hautpartien* zurückgegriffen, die von sogenannten "Fettschürzen-Operationen" stammten. Dies erwies sich insbesondere für größere Versuchsansätze als vorteilhaft.
Sämtliche OP-Präparate waren frei von subkutanem Fettgewebe. In Einzelfällen erhielt ich Spalthautpräparate mit einer Schnittdicke von ca. 0.2 mm.
In einigen Fällen waren auf der Hautoberfläche Reste von Farbstoff erkennbar (i.e. präoperative Schnittführungsmarkierung). Entsprechende Areale wurden im Hinblick auf potentielle Verfälschungen der Ergebnisse vorsorglich eliminiert.

Alle Präparate wurden baldmöglichst weiterverarbeitet. Dies geschah in 90 % der Fälle innerhalb der ersten Stunde nach Erhalt, in den restlichen Fällen bis zum Ablauf der zweiten Stunde. Für spezielle Fragestellungen wurde die "postoperative Liegezeit" aber auch fallweise beträchtlich prolongiert. Hierbei wurde die Haut bei 4°C gekühlt.
Das Alterspektrum der Patientinnen lag *zwischen 15 und 53 Jahren.* Alle waren zum Zeitpunkt der Operation gesund und wiesen keine dermatologischen Veränderungen im Operationsbereich auf.

6. ORGANKULTUR HUMANER HAUT

6.1. Vorbereitung der Haut

Mittels eines *Einwegdermatoms (Davol-Simon, Bard Inc., Sockanosset, MA, Bezugsquelle: Delasco Dermatological Supplies, Council Bluffs, Iowa, U.S.)* wurden unter sterilen Kautelen zunächst dünne Hautproben gewonnen (Dicke 0.2 - 0.3 mm), welche in weiterer Folge für etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem Cocktail aus
(1) *30 ml RPMI*
(2) *300 µl Gentamycin (JRH, Bioscience), [Endkonzentration: 500 µg/ml, dies entspricht dem 10-fachen der üblichen Arbeitskonzentration]*
(3) *770 µl eines 1-molaren Hepes Puffers*
gewaschen wurden. Für diese Prozedur praktisch bewährt hat sich ein 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht). Sodann konnte die Haut mittels Skalpell in einer sterilen Petrischale in ca. *15 x 15 mm kleine Einzelstücke* zerkleinert werden, worauf die Haut nun für die Organkultur vorbereitet war.

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

6.2. Organkultur

Als Kulturgefäß kam ein Doppelkammersystem (siehe Abbildung) zum Einsatz (24 mm Transwell ™ porous cell culture insert; Tissue culture treated, 3.0 µm pore, polycarbonate membrane; Kat. Nr. 3414, Costar, Cambridge, MA).
15 x 15 mm kleine, vorbereitete Hautstücke wurden unter sterilen Bedingungen mit der dermalen Seite nach unten in Einsätze gelegt, deren Boden aus einer porösen Membran *(Porendurchmesser 3 µm)* besteht. Diese Einsätze konnten derart in die 6-well Platten eingesenkt werden, daß die Membran 1 mm über dem Boden des jeweiligen wells zu liegen kam. Darunter liegender Raum bleibt dem Kulturmedium vorbehalten, weches die Möglichkeit hat, durch die Poren zu diffundieren und die auf der Membran liegende Haut mit Nährstoffen zu versorgen. *1.8 ml Nährmedium / well* erwies sich als optimal.
Wieviele "wells" mit Hautstücken belegt wurden ergab sich aus der Anzahl der gewünschten Entnahmezeitpunkte.
Zusammenfassend ergeben sich somit folgende Vorraussetzungen:
Die dermale Seite der Haut bekommt Kontakt zum Nährmedium, die epidermale Seite liegt über Medium-Niveau und bleibt somit trocken.
Die Organkulturplatte wurde nach vollendetem Beladen mit einem Deckel verschlossen und bei *37°C und 5 % CO_2-Anteil* inkubiert.
Maximal 24 Stunden nach Kulturbeginn war eine *Erneuerung des Nährmediums* obligatorisch.

Die Gesamtdauer der Organkultur betrug in den meisten Fällen 48 Stunden. In einigen Fällen wurde sie ausnahmsweise auf 72 Stunden erhöht, wobei hier ein zweiter Mediumwechsel nach 48 Stunden durchgeführt wurde.
Nach Ablauf von *24 bzw. 48 Stunden (fixe Zeitpunkte)*, sowie nach *6-8 bzw. 33-36 Stunden (variable Zeitpunkte)* wurde jeweils 1 Membraneinsatz mit der darauf befindlichen Haut entnommen, welche nun mittels Skalpell in 3 Teile zerschnitten wurde. Hierbei entfielen auf Teil 1 und 2 jeweils ca. 1/6 der Gesamtfläche, auf Teil 3 2/3. *Teil 1* wurde nach kurzer Zwischenlagerung mit 5 % - Formalin Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Kontrollhistologie). *Teil 2* sollte Ausgangsmaterial für die spätere Anfertigung von Gefrierschnitten sein und wurde, in Alufolie verpackt, zunächst bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. *Teil 3* war für die der Herstellung epidermaler und dermaler "sheets" bestimmt und nahm deswegen den flächenmäßig größten Teil für sich in Anspruch. In aller Regel folgte die "sheet"-Herstellung" unmittelbar nach Entnahme der Haut. Unter bestimmten Umständen kann diese Prozedur aber auch auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden. Die Haut wird hierfür einfach, wie oben beschrieben, tiefgefroren. Der *Sinn dieser Dreiteilung* sollte darin bestehen, nach der endgültigen Verarbeitung der Einzelstücke, zweidimensionale Einblicke in die Haut zu ganz bestimmten Zeitpunkten zu ermöglichen, um somit etwaige morphologische und immunphänotypische Veränderungen über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachten zu können. Als Referenz hierfür wurden Gefrierschnitte und "sheets" des Zeitpunktes "0-Stunden" herangezogen. Die fixen Zeitpunkte sollten zudem die Vergleichbarkeit von Operationspräparaten vieler unterschiedlicher Patientinnen ermöglichen.

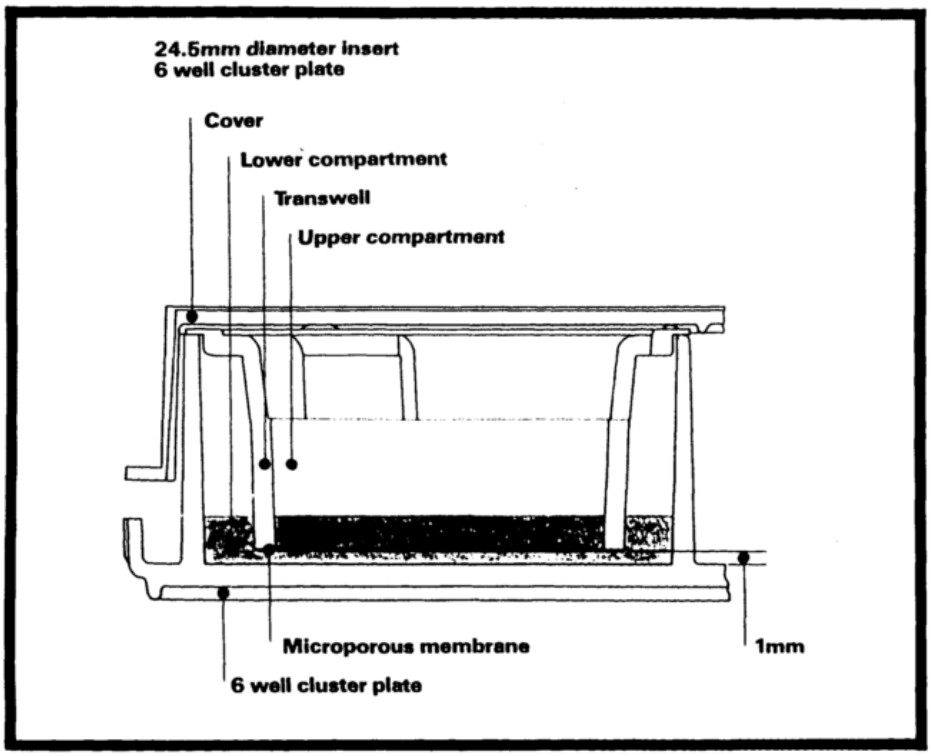

Abb.1. Schnitt durch das Doppelkammersystem des Organkulturgefäßes.

7. HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

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

7.1. Beschichtete Objektträger

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

7.2. Gefrierschnittechnik

Als Gefrierschnittmaschine (Kryostat) diente ein FRIGOCUT 2800 der Firma Reichert-Jung. Die Boxtemperatur betrug -26°C, die Objekttemperatur -24°C.
Bis dahin bei -20°C eingefrorene Hautstücke wurden zunächst kurz angetaut und dann unter Zugabe einiger Tropfen PBS zwischen 2 unbeschichteten Objektträgern (76 x 26 mm / 3 x 1 inch) erneut eingefroren. Die Idee zu diesem kleinen *Trick* enstand, als ich zu wiederholtem Male an fertig immunhistochemisch gefärbten Gefrierschnitten feststellen mußte, daß die Epidermis abschnittsweise verdickt erschien und ihren charakteristischen Schichtenbau vermissen ließ. Es handelte sich dabei um ein Schneideartefakt, das dadurch zustande kam, daß bedingt durch feine Fältelung der Haut, die Epidermis beim Schneidevorgang immer wieder schräg getroffen wurde. Gerade dies war aber für meine Fragestellung ungeignet. Ziel des oben erwähnten Tricks sollte sein, ein absolut planes Hautstück und somit eine faltenlose Epidermis zu erhalten.
Um eine präzise vertikale Schnittführung durch die Haut zu bekommen, war es zumindest genauso wichtig, obiges planes Hautstück in weiterer Folge mit einer Pinzette derart aufzublocken, daß zwischen Haut und Schneidetischchen ein rechter Winkel enstand.
Nun konnten die 8.0 µm dünnen Schnitte angefertigt und auf die bereits vorbereiteten Objektträger aufgebracht werden.
Dem schloß sich ein Trockenvorgang von 60 Minuten bei Raumtemperatur an, gefolgt von erneutem Einfrieren bei -20°C bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung oder einer sofortigen Färbung.

8. INDIREKTE IMMUNPEROXIDASEFÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

8.1. Vorbereitung

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

8.2. Färbesequenz

Primärantikörper

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

Spülen 1

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

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

Sekundärantikörper

Verwendet wurden hierfür, je nach Herkunft des Primärantikörpers (Maus oder Ratte), entsprechende *biotinylierte spezies-spezifische ganze Antikörper vom Schaf (Amersham, UK, Kat. Nr.1001,1004). Die Arbeitsverdünnung betrug in allen Fällen 1 : 200.* Dies erreichte man automatisch durch Zugabe von *5 µl Antikörper-Lösung* zu einem Gemisch aus:
(a) 795 µl PBS/1% BSA
(b) 100 µl 2-molare beta-D-Glucoselösung
(c) 100 µl Glucoseoxidase [15 U/ml]
In diesem Arbeitsschritt wurden zudem die "endogenen Peroxidasen" geblockt.
Menge der AK-Lösung sowie Inkubationsbedingungen wie oben beschrieben.

Spülen 2

Tertiärreagens

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

Spülen 3

Visualisation des Peroxidase-Konjugates

5 ml Natriumacetat-Puffer wurden zunächst *250 µl "AEC-Lösung"* (i.e. 4 mg AEC 3-Amino-9-Ethylcarbarol, Sigma, in 1ml Dimethylformamid) zugesetzt, daraufhin filtriert und gut vermischt (Vortexer).
Die Zugabe von *10 µl 30 % Perhydrol (Merck, Darmstadt)* bewirkt schließlich die Ingangsetzung der chemischen Reaktion. *50 - 70 µl dieser Lösung* wurden auf jeden Objektträger pipettiert und dort für *ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur* belassen.

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

Gegenfärbung der Kerne

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

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

Eindecken

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

Lagerung der Präparate

Im Kühlschrank bei *4°C.*

9. HERSTELLUNG EPIDERMALER SHEETS UND GEWINNUNG VON DERMIS

Die der Organkultur zu einem definierten Zeitpunkt entnommenen Hautstücke wurden zunächst mittels zweier feiner Pinzetten zum *Aufschwimmen auf eine 0.5-molare Ammoniumthiocyanatlösung* gebracht, wobei die dermale Seite nach unten gerichtet war. Diese Prozedur erwies sich regelmäßig als problematisch. Dies deshalb, weil die kleinen Hautstücke dazu neigten, sich randständig einzurollen und somit Teile der Epidermis unter die Flüssigkeitsoberfläche zu ziehen. Weitgehend gelöst werden konnte diese Schwierigkeit dadurch, daß die Hautstückchen vor dem Aufschwimmen sorgfältig in einem Papiertuch trockengetupft wurden, was bewirkte, daß sich die Stücke problemlos der Oberflächenspannung der Flüssigkeit anschmiegten und gleichmäßig aufschwammen.
Es folgte eine *Inkubationsphase bei 37°C für 45 - 60 Minuten.*

Anmerkung. Kürzere Inkubationszeiten von etwa 25 - 30 Minuten, wie von Juhlin & Shelley in den Acta Dermatovener. 57:289-296, 1977 vorgeschlagen, erwiesen sich häufig als zu kurz, um eine akkurate und leichtgängige Trennung von Epidermis und Dermis zu ermöglichen.
Variable Dicken dermaler Anteile nach Dermatombehandlung erforderten variable Inkubationszeiten. Je dicker, desto länger.

Nach Inkubationsende wurden die Hautstücke auf eine Glasplatte transferiert, die vorher mit PBS ohne BSA befeuchtet worden war. Hier erfolgte nun unter Verwendung zweier feiner gebogener Pinzetten die behutsame kontinuierliche Ablösung der Epidermis, die sich daraufhin auf dem PBS-Puffer problemlos eben ausbreiten ließ. Mit einem Skalpell wurde dann die Epidermis in *etwa 3 x 3 mm* kleine "epidermale sheets" zerkleinert.
Diese fixierte man gemeinsam mit der unzerschnittenen Dermis *20 Minuten in reinem Aceton in einer Glas-Petrischale.*
Den Abschluß bildeten eine *20 minütige Waschung der "sheets" in PBS ohne BSA* sowie in der Folge jeweils *2 ebenfalls 20 minütige Waschungen in PBS/1%BSA.*
Nun konnten die fertigen "sheets" sowie die Dermis in Alufolie verpackt, bei -196°C schockgefroren und bei -20°C dauergelagert werden.

Anmerkungen zur Qualitätssicherung.
1. Es besteht die Möglichkeit, daß während des Trennens von Epidermis und Dermis basale epidermale Anteile auf der Dermis zurückbleiben, was zunächst unbemerkt bleiben kann. Dieses Artefakt führt jedoch zu einer maßgeblichen Qualitätsminderung immunhistochemisch gefärbter epidermaler "sheets".
Bei mikroskopischer Betrachtung stellen sich scheinbar "Langerhanszell-arme bzw. freie Areale" dar, ohne daß die Homogenität der Epidermis gestört erscheint. Erliegt man diesem Eindruck, so sind gravierende Fehler bei der Befundung vorprogrammiert. Um dem zu entgehen, empfiehlt sich folgendes Vorgehen: Man legt dazu ein Blatt dunkelblaues Papier unter jene Glaspetrischale, auf welcher man die Trennung bzw. das Zerkleinern der Epidermis zu "sheets" bewerkstelligt. Werden die "sheets" in der Folge von oben mit Licht bestrahlt, so lassen sich "Dichte-Inhomogenitäten" bei jenen erkennen, welche basaler Schichten entbehren. Diese "sheets" werden verworfen. Da nicht alle Inhomogenitäten auf fehlenden basalen Schichten beruhen, sind stets die "homogensten sheets" als Vergleich heranzuziehen. Zudem gilt bei der Entscheidungsfindung: In dubio pro re.
2. Sollten trotz obiger Vorgangsweise weiter Mängel auftreten, so ist es durchaus nicht zum Schaden der "sheets", die Konzentration von Ammoniumthiocyanat von 3.8 g je nach Bedarf auf bis zu 6 g /100 ml A.dest. zu erhöhen, was das Trennen von Epidermis und Dermis erleichtert. Diese Maßnahme ist im übrigen besonders dann empfehlenswert, wenn der dermale Anteil nach Dermatombehandlung etwas dicker ausgefallen ist.

Alternative Methode

Für spezielle Fragestellungen ist es wünschenswert, eine Trennung von Epidermis und Dermis unter sterilen Kautelen "ante culturam" durchzuführen. Da Ammoniumthiocyanat infolge seiner Zytotoxizität hierfür ungeeignet ist, erwies sich folgende Methode als besonders geeignet:
5 ml RPMI (Seromed Biochrom, Berlin) und *5 ml Dispase Typ II (Boehringer), [Endkonzentration 1.2 U/ml]*, eine neutrale Protease bakterieller Provenienz wurden in eine Petrischale pipettiert und die der Organkultur entnommenen Hautstücke darauf zum Aufschwimmen gebracht (siehe oben).
Nach *50 - 60 minütiger Inkubation bei 37°C* konnte, wie weiter oben ausgeführt, die Epidermis abgelöst werden.

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

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

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

Sekundärantikörper
Biotinylierte Antikörper vom Schaf (Amersham), dem Primärantikörper entsprechend, gegen Maus, Ratte oder Kaninchen gerichtet.
Die gängige Arbeitsverdünnung betrug *1 : 200 (in PBS/1%BSA).*
50 µl per Eppendorf.
Die Inkubation erfolgte bei *37°C* und erstreckte sich über *90 Minuten.*

Waschen 2
Entsprechend *wie in Waschen 1.*

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

Waschen 3
Wie oben.

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

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

Einbetten der "Peroxidase-sheets"
Wie oben.

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

11.1. Einleitende Vorbemerkungen

Die mikroskopische Exploration dermaler "sheets" hinsichtlich der Darstellbarkeit und Auffindbarkeit gesuchter immunphänotypischer Merkmale erwies sich seit jeher als problematisch. Verantwortlich dafür war in erster Linie die relative "Dicke" dermaler "sheets", welche die Möglichkeiten der Durchlichtmikroskopie mitunter erschöpften.
Selbst die dünne Ohrhaut von Mäusen, Lieblingsobjekt der Begierde muriner Langerhanszell-Forschung, besitzt noch eine beachtlich "dicke" Dermis. Die hierbei die gesamte Dermis umfassenden "sheets" erfordern schon gewisse Kompromisse bei Betrachtung und photographischer Dokumentation, erlauben aber im wesentlichen die von der Epidermis abgetrennte Dermis *direkt* als sog. "dermales sheet" zu verwenden und immunhistochemisch auszuwerten.
Gänzlich anders stellt sich die Situation bei Humanhaut dar. Hier ist der Einsatz eines Dermatoms unumgänglich um, nebst der Schaffung optimaler Vorraussetzungen für die Organkultur, bei der Dermis-Dicke in einen überhaupt "mikroskopierbaren" Bereich zu gelangen. Und selbst dann variieren die Dicken des dermalen Anteils beträchtlich. Es ist zwar prinzipiell auf diese Art und Weise möglich, sehr dünne dermale "sheets" zu gewinnen, jedoch ist dies erstens nicht die Regel und zweitens nimmt man damit

bewußt in Kauf, nicht wie bei der Maus die gesamte Dermis, sondern eben nur den gerade obersten Teil für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben.
Zu der Problematik des Mikroskopierens gesellt sich im übrigen eine nicht minder bedeutende, grundlegende Schwierigkeit, nämlich jene der, mit zunehmender Dermis Dicke inhibierten Antikörperpenetration.
All diese Einflüsse erschwerten respektive verhinderten letztendlich, sich ein Gesamtbild über die Verhältnisse in der *humanen* Dermis zu schaffen. Ich entschloß mich also zu einem neuen Lösungsansatz.

11.2. Prämissen

Oberstes Ziel war in erster Linie die Verringerung der Dicke der zu explorierenden dermalen Strukturen. Da diese neue Methode primär für den Nachweis dendritischer Zellen in afferenten dermalen Lymphgefäßen konzipiert wurde und anzunehmen war, daß diese in den meisten Fällen nicht parallel zur Hautoberfläche verlaufen, konnte die Dicke der Dermis nicht bedingungslos verringert werden. Es war im besonderen Bedacht auf die Tatsache zu nehmen, daß die lymphatischen Gefäße, wenn auch nur über kürzere Strecken, mikroskopisch in ihrem Verlauf verfolgbar sein sollten. Hierfür war ein "goldener Mittelweg", ein Kompromiß vonnöten. Die Vorteile einer möglichst geringen Dermisdicke, wie optimale Antikörperpenetranz, Transparenz und luzide Darstellung immunphänotypischer Charakteristika durften also nicht nur aus Rücksicht auf Lymphgefäßverlauf und Überblick nicht ausgereizt werden, sondern auch um der sich immer schwieriger gestaltenden praktischen Handhabung hauchdünner dermaler Präparate willen.
In mehreren Pilotversuchen zeigte sich sehr bald, daß obigen Ansprüchen dann am besten entsprochen wird, wenn die Dicke der zu untersuchenden Dermis zwischen 50 und 80 µm liegt.

11.3. Prinzip

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

11.4. Ergebnis

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

11.5. Technik

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

VORBEREITUNG

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

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

EINBETTEN DER DERMIS

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

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

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

SCHNEIDEN

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

LAGERUNG

Nach jedem Schnitt wurde das jeweilige dermale "sheet" in noch tiefgefrorenem Zustand mittels einer feinen Pinzette auf einen unbeschichteten Objektträger aus Glas transferiert. Nachfolgende "sheets" wurden daneben plaziert. War die Serie komplett, erfolgte die Abdeckung mit einem zweiten Objektträger. Auf diesem konnte nun leicht eine Kennzeichnung erfolgen, die erkennen lassen sollte, welche Position das jeweilige "sheet" innerhalb der Schnittserie einnahm. Dies wiederum ließ Rückschlüsse auf die ursprüngliche Lokalisation in der Dermis zu.
Die Wahl der Lagerung auf Glas war keineswegs Zufall, sondern hatte vielmehr ihren Sinn darin, als Unterlage für das Zerschneiden der doch noch relativ großen "sheets" (Reserve) in etwa 3 x 3 mm kleine, wie sie für die Immunhistochemie notwendig waren. Zudem war auf diese Art und Weise kein neuerliches Verbringen der "sheets" auf eine geeignete Unterlage vonnöten, sodaß sich die qualitätsmindernden

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

11.6. Imunhistochemie "Dermaler Transversalschnitte"

Die auf 3 x 3 mm Größe getrimmten Transversalschnitte wurden *"schwimmend"* einer immunhistochemischen Färbung zugeführt, wie sie schon im Kapitel "Färbung epidermaler "sheets" näher erläutert wurde.
Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte in kleinen Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die Waschvorgänge gelangen am besten in 24-well Kulturplatten. Einbettmedium war Vectashield Mounting Medium.

12. HERSTELLUNG UND FÄRBUNG VON ZYTOZENTRIFUGENPRÄPARATEN

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

12.1. Ernten der Zellen

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

12.2. Herstellung der Zytozentrifugenpräparate

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

12.3. Immunhistochemie von Zytopräparaten

VORBEREITUNG
Aufgetaute Präparate wurden *1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet,* anschließend *5 Minuten in Aceton fixiert und nochmals 20 Minuten getrocknet.*
Um ein Zerfließen der Antikörper-, bzw. Waschlösungen zu verhindern, erfolgte eine Umrandung der Zellen mit einem speziellen Fettstift *(PAP-Pen).*

FÄRBESEQUENZ/IMMUNFLUORESZENZ

1. Inkubation mit dem *Primärantikörper*:
   Pro Objektträger wurden 50 - 60 µl Antikörperlösung aufpipettiert.
   Die Inkubation erfolgte in einer sog. " feuchten Kammer " bei 37°C über 30 Minuten.

2. *Waschen* mit PBS/1%BSA
Hierfür wurde nach Absaugen der Antikörperlösung der Puffer mit einer Pasteurpipette aufgetropft und kurz darauf wieder abgesaugt. Dieser Vorgang erfolgt etwa fünf Mal in Folge.

3. *Inkubation mit dem Sekundärantikörper.*
Durchführung wie in 1.

4. *Waschen* in PBS/1%BSA
Durchführung wie in 2.

5. *Inkubation mit dem Tertiärreagens*
Durchführung wie in 1.

6. *Einbetten* in Vectashield Mounting Medium.

13. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Der Organkultur entnommene humane Vollhautpräparate wurden zunächst in PBS gewaschen und hierauf nach Standardmethoden fixiert (Formaldehyd-Glutaraldehyd Fixans nach Karnovsky, Osmium), kontrastiert (Uranylacetat), entwässert und in Epon eingebettet (107).
Die Befundung der "Ultradünnschnitte" erfolgte am Philips Elektronenmikroskop EM 400 (Philips, Eindhoven, Niederlande).

14. MIKROSKOPISCHE BEFUNDUNG UND AUSWERTUNG

14.1. Phasenkontrastmikroskopie

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

14.2. Durchlichtmikroskopie

Sie diente in erster Linie der Auswertung sämtlicher, nach der indirekten Immunperoxidase gefärbten Präparaten, i.e. epidermale "sheets" und Gefrierschnitte.
In Einzellfällen wurden auch "Dermis-Transversalschnitte" beobachtet, die i.R. eines Pilotversuchs mit obiger Technik behandelt waren. Verwendung fand ein OLYMPUS BH2 BHS DL-Mikroskop.

14.3. Immunfluoreszenzmikroskopie

Hierfür stand ein Forschungsmikroskop ORTHOPLAN II, Leitz, Wetzlar, Germany, in Verbindung mit einer Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung und einem Leitz Vario Orthomat (Mikrophotographie-Einrichtung) zur Verfügung.
Es diente vor allem der semiquantitativ-deskriptiven Auswertung von "Dermis-Transversalschnitten", leistete aber auch bei der Beurteilung epidermaler "sheets" sowie Zytozentrifugenpräparaten gute Dienste.

14.4. Ermitteln der Langerhanszelldichte in der Epidermis

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

14.5. Photographische Dokumentation

IMMUNPEROXIDASE

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

IMMUNFLUORESZENZ

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

15. TABELLE 3 : ÜBERSICHT ÜBER SÄMTLICHE VERWENDETE ANTIKÖRPER

15.1. PRIMÄRANTIKÖRPER

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

Kontroll-IgG2a		Maus IgG2a	BDIS	
Kontroll-Ig G1	α-DNP	Maus IgG1	ATCC	
Kontroll-IgG2b	TIB93	Maus IgG2b	ATCC	
Kontroll-IgM	TIB99	Maus IgM	ATCC	
Kontroll-IgM	MAC-3	Ratte IgM	ATCC	

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

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

15.2. SEKUNDÄRANTIKÖRPER

In Abhängigkeit des verwendeten Primärantikörpers kamen folgende Sekundärantikörper zum Einsatz:

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

15.3. TERTIÄR-REAGENZIEN

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