

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Charakteristische Aspekte des Migrationsverhaltens kutaner dendritischer Zellen im Humansystem

Lukas, Michael Alexander

1996

III. Ergebnisse

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12531](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12531)

III. ERGEBNISSE

A. LANGERHANSZELLEN VERLASSEN DIE EPIDERMIS WÄHREND DER ORGANKULTUR

1. Der Gefrierschnitt - Simultane Beurteilung von Epidermis und Dermis

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

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

1.1. Das CD1 Antigen

1.1.1. Subcluster CD1a

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

Zeitpunkt "Null Stunden" (Referenz)

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

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

Zeitpunkt "24 Stunden"

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

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

Zeitpunkt "48 Stunden"

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

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

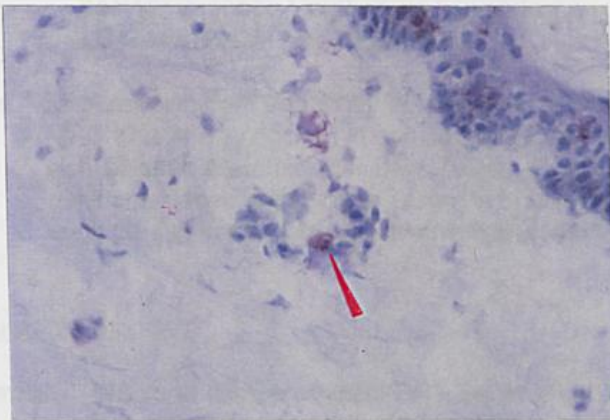


Abb.2. Seltener Befund einer sich offenbar *im Lumen* eines dermalen Blutgefäßes befindenden CD1a+ dendritischen Zelle (Pfeil). Spekulativ könnte es sich dabei um eine aus dem Blutgefäßsystem *in die Haut einwandernde* (Vorläufer-?) Zelle handeln. Peroxidasefärbung. (x200)

1.1.2. Subcluster CD1b

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

1.1.3. Subcluster CD1c

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

1.2. MHC Klasse II Antigene

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

Zeitpunkt "Null Stunden"

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

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

Zeitpunkt "24 Stunden"

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

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

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

Zeitpunkt "48 Stunden:

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

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

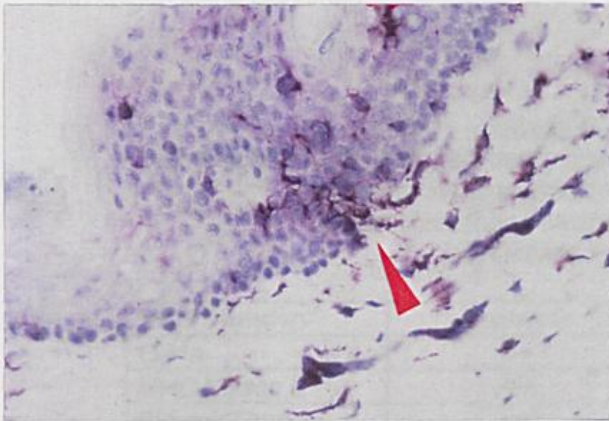


Abb.3. Längsschnitt durch die Haut nach 33 Stunden Organkultur: Areal konzentrierter Emigration stark HLA-DR positiver dendritischer Zellen aus der Epidermis (Pfeil). Peroxidasefärbung. (x200)

1.3. Langerhanszell-Granula (Birbeck-Granula)

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

Zeitpunkt "Null Stunden"

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

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

Zeitpunkt "24 Stunden"

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

Dermis: Einige wenige angefärbte Zellen bevölkern die papilläre Dermis.

Zeitpunkt "48 Stunden"

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

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

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

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

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

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

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

2.1.1. CD1a-Antigen

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

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

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

2.1.2. MHC Klasse II

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



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

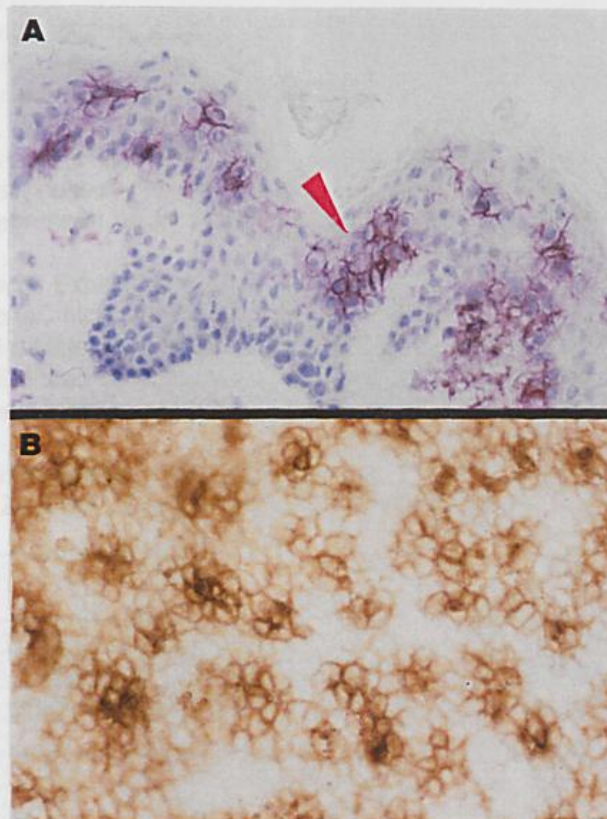
24 Stunden später läßt sich bei leicht reduzierter Gesamtzellzahl objektiv eine deutliche Zunahme der Expression von MHC Klasse II auf den in der Epidermis verbliebenen Langerhanszellen nachweisen. Neben der deutlich intensivierten Färbung stechen außerdem die vergrößerten Zelleiber und die verkürzten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

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

2.1.3. Langerhanszell-Granula (Birbeck-Granula)

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

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



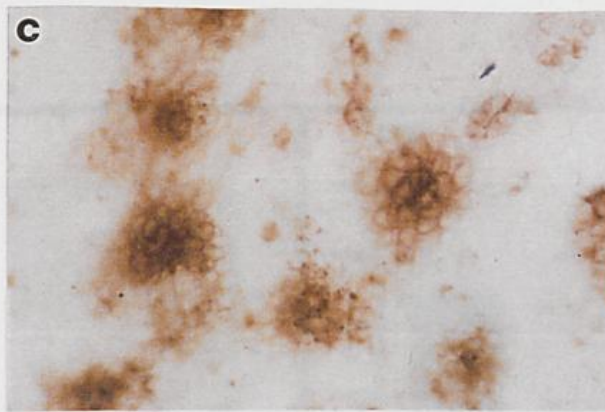


Abb.5. A Längsschnitt durch die Haut nach 48 Stunden Organkultur: Die Darstellung von HLA-DR zeigt neben der intensiven Anfärbung der Langerhanszellen zudem in deren Nähe eine zarte Umsäumung der Keratinozyten: "Bällchen" (Pfeil). Rechts unten: Areal mit massiver Emigration epidermaler dendritischer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

3. Epidermale Emigrationskinetik

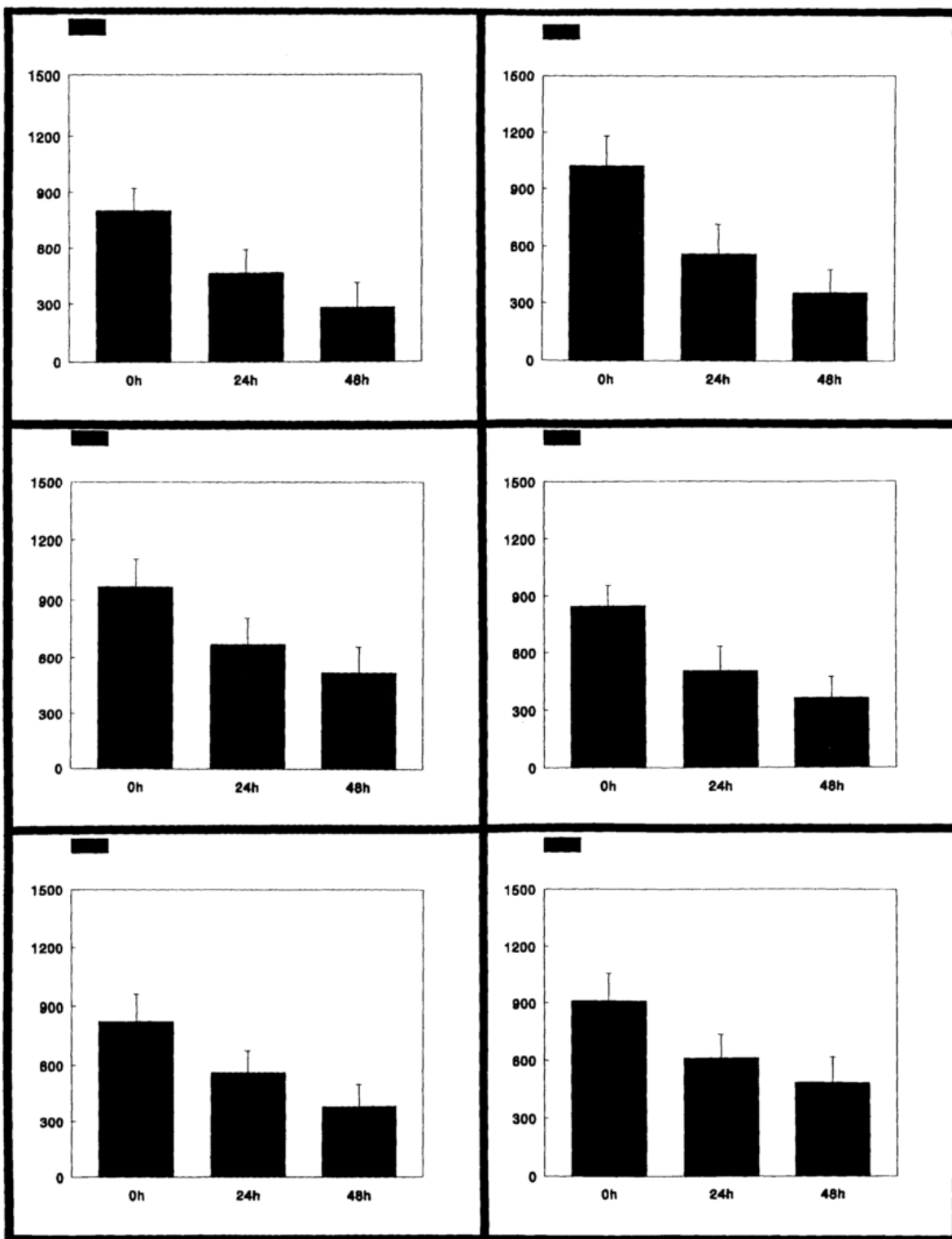
3.1. Emigrationskinetik im klassischen Organkultursystem

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

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

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

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



Graphik: Emigration humaner Langerhanszellen im klassischen Organkultursystem.

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

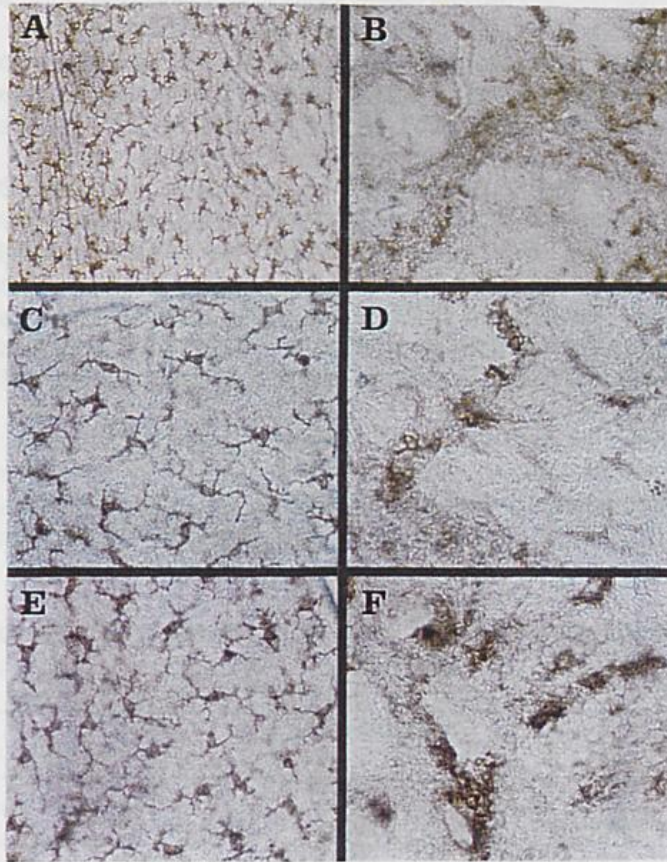


Abb.6. Epidermale Langerhanszellen verlassen die Epidermis während der Organkultur. **A,C,E** Langerhanszellendichte vor Beginn der Organkultur. **B,D,F** Dichte nach 48 stündiger Kultur. **A/B** Darstellung von *CD1a*. (x120), **C/D** Darstellung von *CD1a*. (x230), **E,F** Darstellung von *HLA-DR*.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

3.2. Emigrationskinetik im "Epidermis-only"- System

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

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

Ergebnis:

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

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

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

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

B. LANGERHANSZELLEN EMIGRIEREN IN DIE DERMIS WÄHREND DER ORGANKULTUR

1. Standard-Organkultur

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

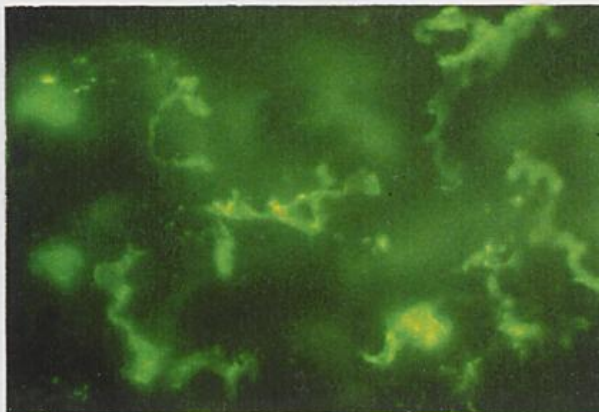


Abb.7. Dendritische Zellen in der oberen papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Darstellung von HLA-DR. Es dürfte sich hierbei sowohl um in der Dermis residente Dermale Dendritische Zellen (DDC) als

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

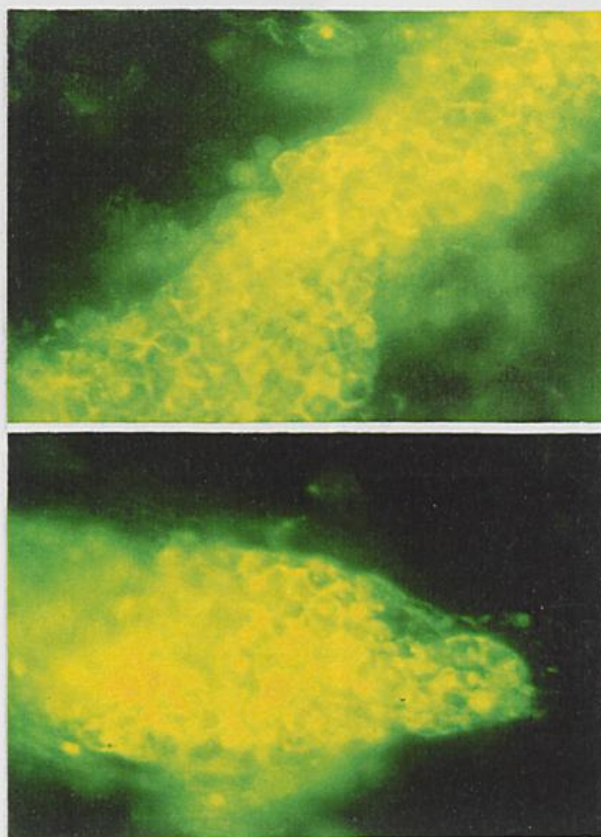
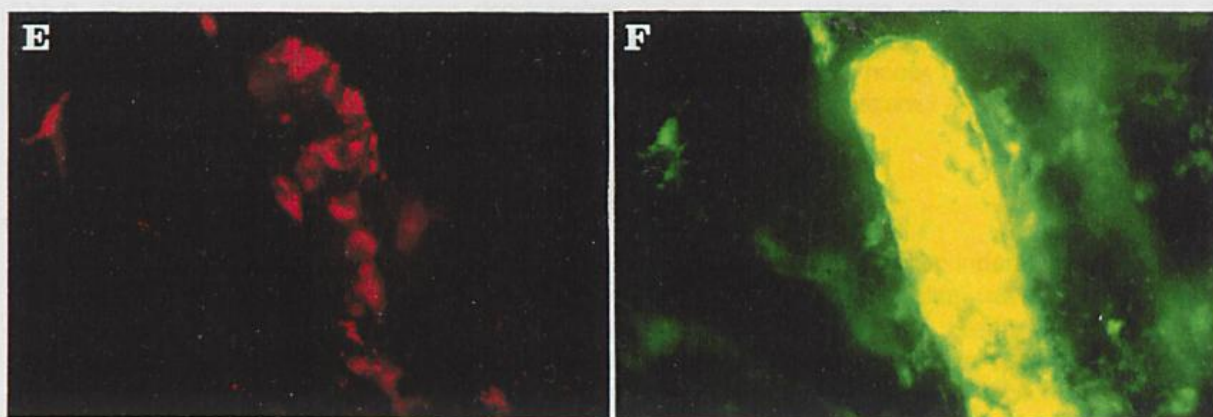


Abb.8. Imposante Akkumulationen stark HLA-DR positiver dendritischer Zellen in der unteren papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Bemerkenswert sind die dichte Zusammenlagerung der Zellen und das typische Fehlen dendritischer Fortsätze (vgl. Abb.7.). Immunfluoreszenz. (x300)



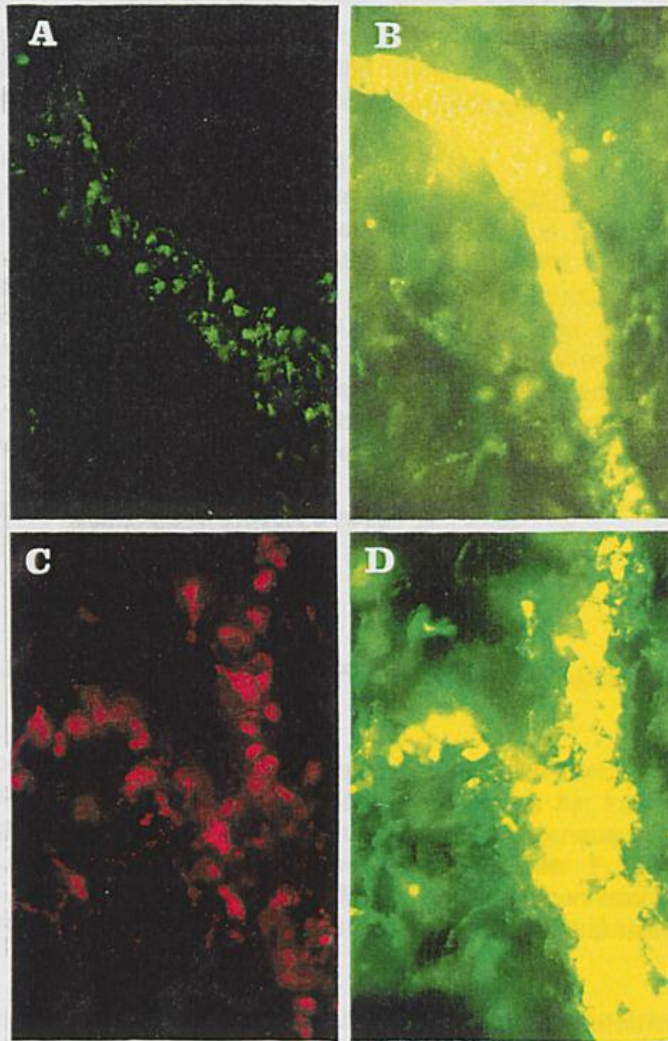


Abb.9. Strangförmige Akkumulationen dendritischer Zellen in der unteren papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. **A** Darstellung der Birbeck-Granula (LAG). (x130). **B** Darstellung von HLA-DR. (x130). **C,D** (x200) **und E,F** (x300) Die Doppelfärbungen verdeutlichen, daß ein hoher Prozentsatz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

2. Die "Dermis-only"- Kultur

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

- (a) Die Dermis wurde so auf der Polycarbonat-Membrane platziert, daß die ursprünglich der Epidermis zugewandte Seite oben zu liegen kam ("*Dermis-only standard*")
- (b) Die Dermis wurde genau umgekehrt aufgelegt, d.h. die ursprünglich der Epidermis zugewandte Seite bekam Kontakt zum Nährmedium ("*Dermis-only invert*").

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

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

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

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

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

Das Bild entspricht dem unter 2.1. dargestellten.

C. LANGERHANSZELLEN AKKUMULIEREN IN AFFERENTEN DERMALEN LYMPHGEFÄSSEN

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

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

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

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

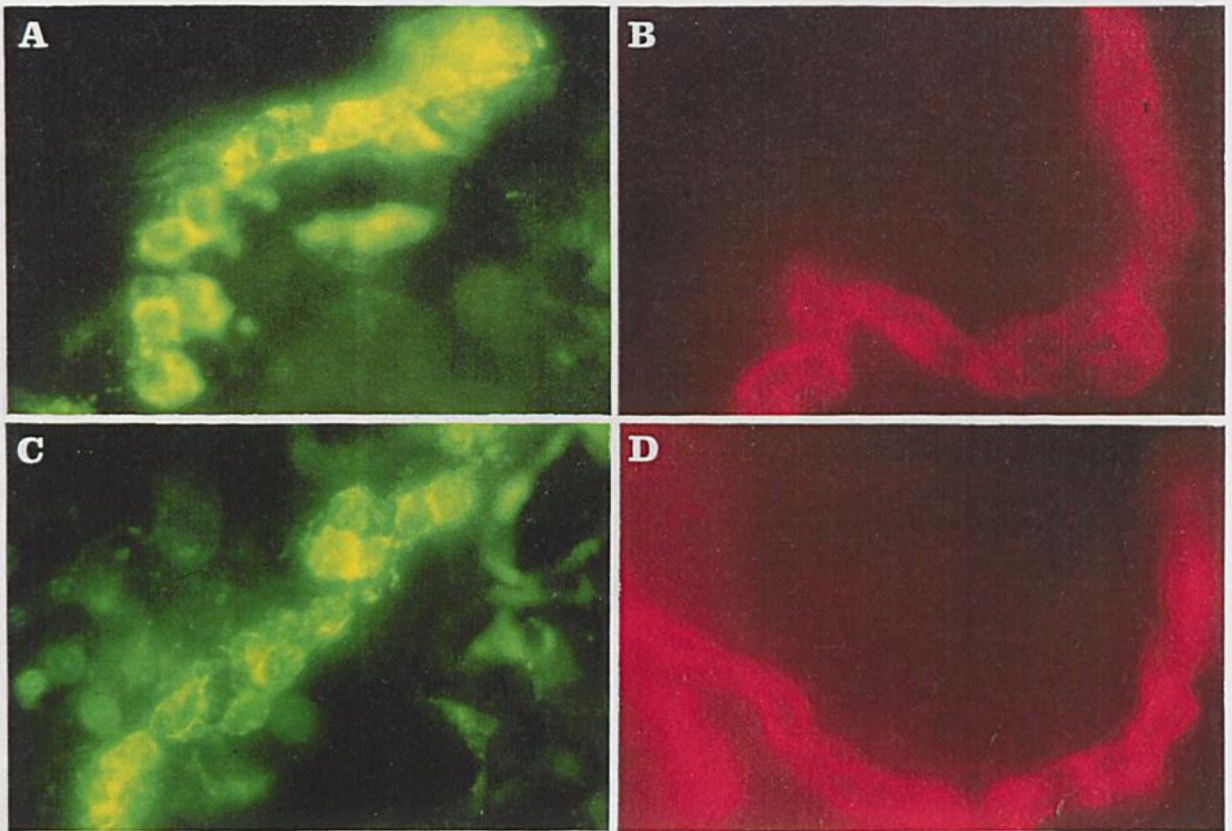


Abb.10. Perlenkettenartige Akkumulation dendritischer Zellen in der tiefen papillären Dermis nach 48 Stunden Organkultur. Die Doppelfärbungen **A/B** und **C/D** zeigen die klare räumliche Distanz zwischen den HLA-DR positiven dendritischen Zellen (grüne Fluoreszenz) in **A,C** und den Faktor VIII positiven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



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

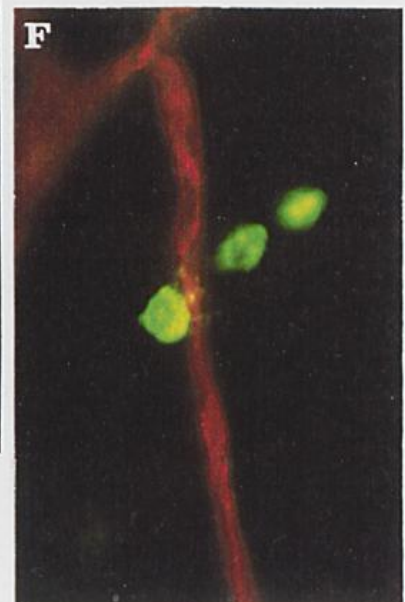
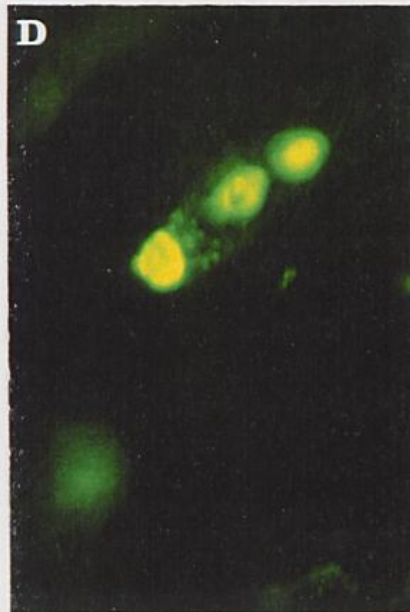
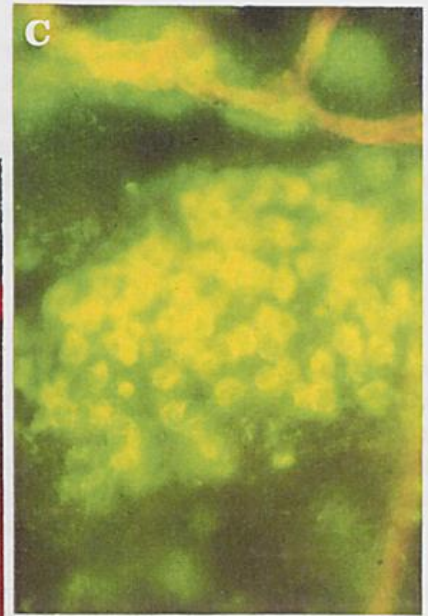
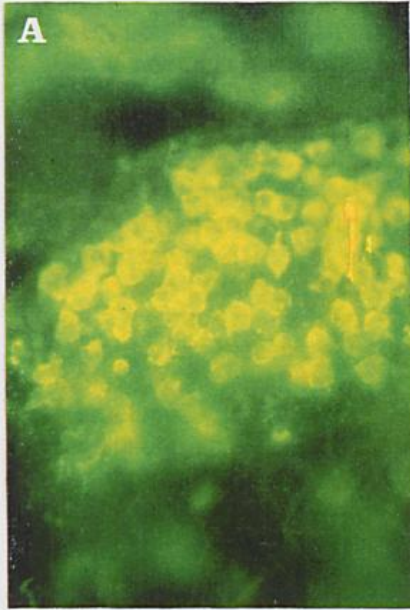


Abb.12. Doppelfärbungen und Doppelbelichtungen der Marker HLA-DR und PAL-E wie in Abb.11.**A-C** (x230), **D-F** (x370)

2. Ergebnisse der Semidünnschnitt-Auswertung

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

3. Ergebnisse der Ultradünnschnitt-Auswertung

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

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

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

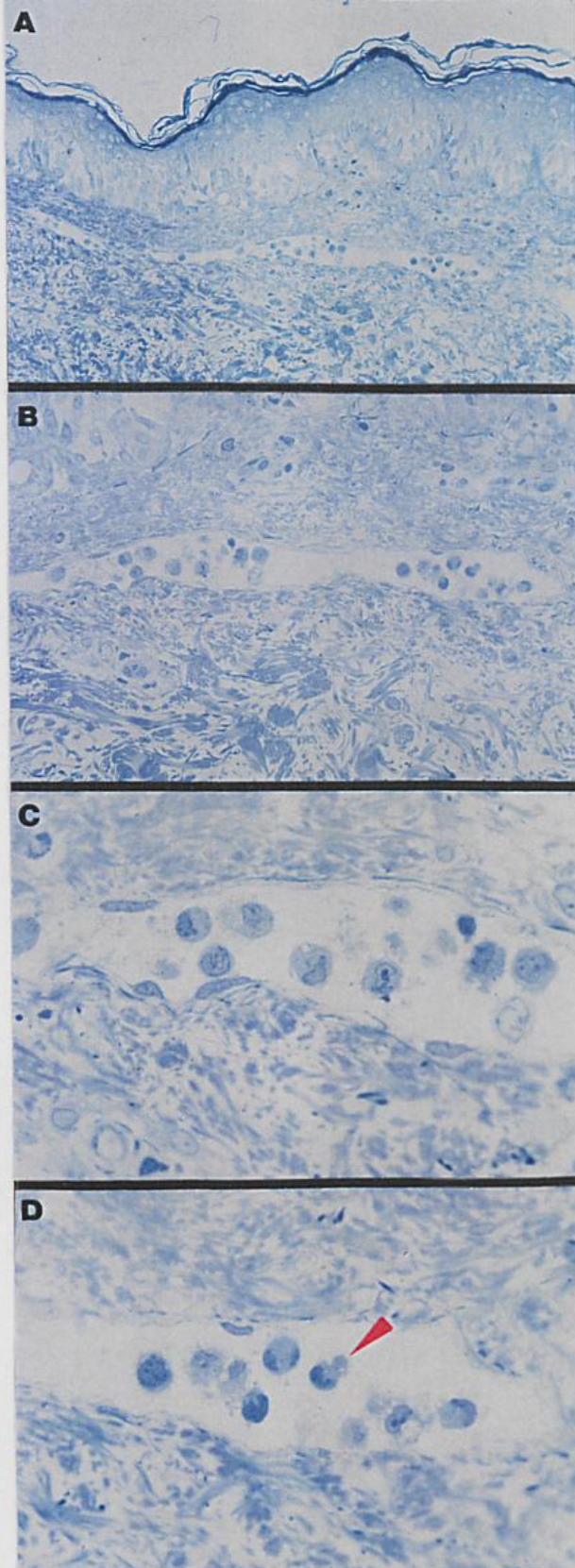


Abb.13. Semidünnschnitte ($1\mu\text{m}$) von über 48 Stunden kultivierter Haut. In einer weiten Spalte der papillären Dermis finden sich zahlreiche Zellen mit einer für dendritische Zellen typischen Morphologie: gelappter, exzentrisch gelegener Zellkern und helles Zytoplasma. **A** ($\times 70$), **B** ($\times 150$), **C,D** ($\times 400$). Der Pfeil weist auf ein Konjugat einer dendritischen Zelle mit einem T-Lymphozyten hin.

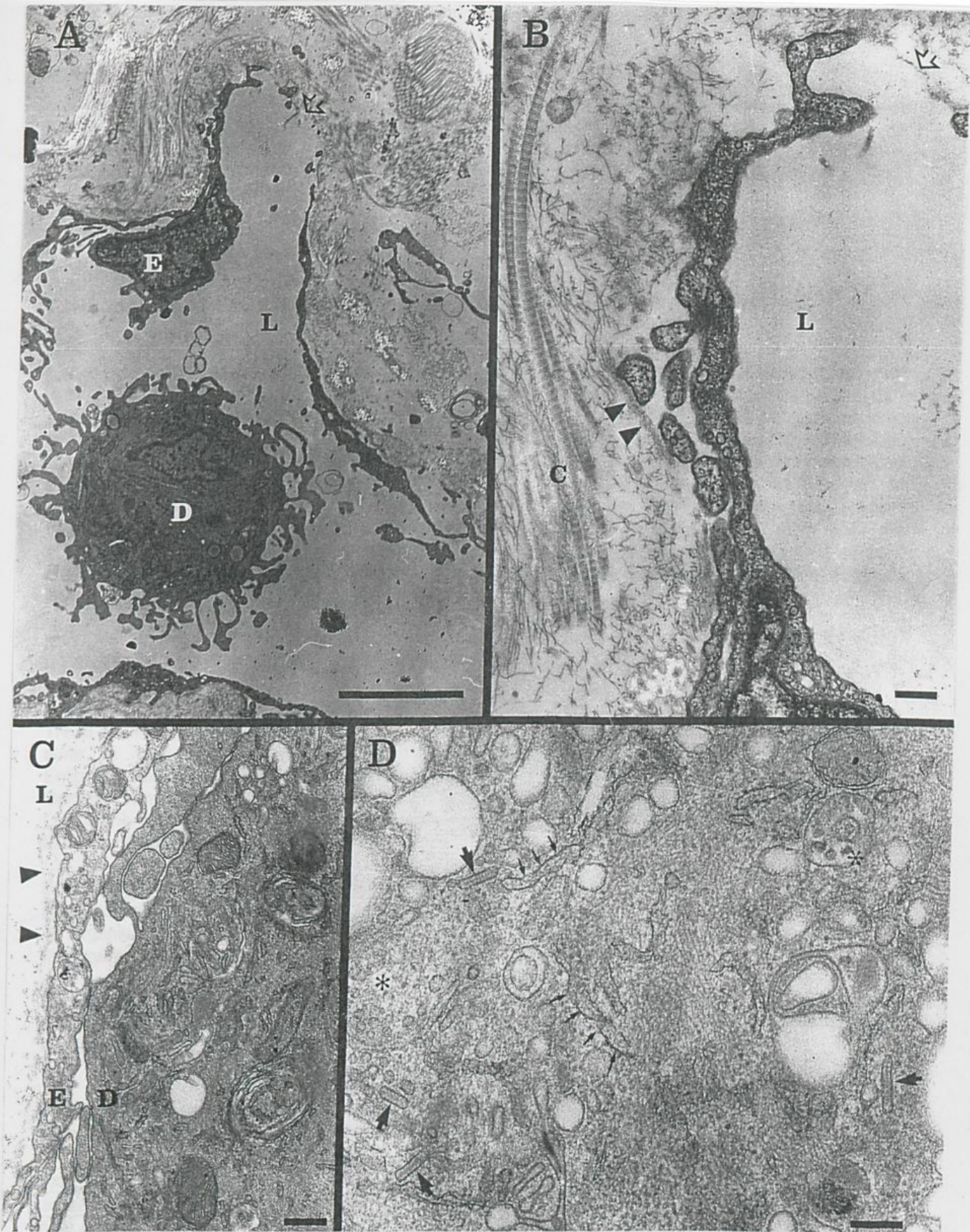


Abb.14. Ultrastruktur eines "cords" nach 48 stündiger Organkultur. Beachtenswert sind die vielen zytoplasmatischen Fortsätze ("veils") der dendritischen Zelle (D) im Lumen eines Lymphgefäßes (L). Das dünne Endothel weist zahlreiche Unterbrechungen auf (offene Pfeile in A und B). Eine Lamina densa ist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

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

D. MECHANISMUS DER EMIGRATION VON LANGERHANSZELLEN AUS DER EPIDERMIS

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

(a) ANSÄTZE ZUR STIMULATION DER EMIGRATION

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

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

Ein Experiment bestand aus jeweils *drei Ansätzen*:

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Versuch der Stimulation durch Zytokine

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

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

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

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

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

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

2.1. Tumornekrose-Faktor alpha

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

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

2.1.2. Einflüsse auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

2.1.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

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

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

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

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

2.2.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

2.2.3. Einfluß auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

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

2.3. Interleukin-1 alpha, Interleukin-1 beta

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

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

2.3.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

2.3.3. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

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

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

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

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

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

2.4.2. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

2.4.3. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

Die Untersuchung dermaler Transversalschnitte ergab keine neuen Aspekte.

(b) ANSÄTZE ZUR HEMMUNG DER EMIGRATION

1. Versuche der physikalischen Emigrationshemmung durch Kühlung

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

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

1.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

1.2. Einflüsse auf die Akkumulationsvorgänge innerhalb der Dermis

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

2. Versuch der Emigrationshemmung durch Anti-TNF-alpha

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

2.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

2.2. Einflüsse auf die Akkumulationsprozesse innerhalb der Dermis

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

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

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

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

2.3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik

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

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

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

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

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

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

3. Versuch der Emigrationshemmung durch humanen TNF- Rezeptor

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

3.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.1. Einfluß auf die Emigrationskinetik im Standardsystem

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

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

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

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

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

Exp. 3			
Standard	899 ± 108	391 ± 89	56%
IL-1 RA	-	430 ± 81	52%

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

Es bestehen *keine ersichtlichen Effekte*.

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

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

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

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

(c) EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN

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

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

1. E-CADHERIN

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

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

Ergebnis

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

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

2. CD44-MOLEKÜL

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

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

Ergebnis

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

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

3. ALPHA-4 INTEGRIN

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

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

Ergebnis

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

4. KUTANES LYMPHOZYTEN-ASSOZIIERTES ANTIGEN (CLA)

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

Ergebnis

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

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

E. CHARAKTERISIERUNG EMIGRIERTER KUTANER DENDRITISCHER ZELLEN

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

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

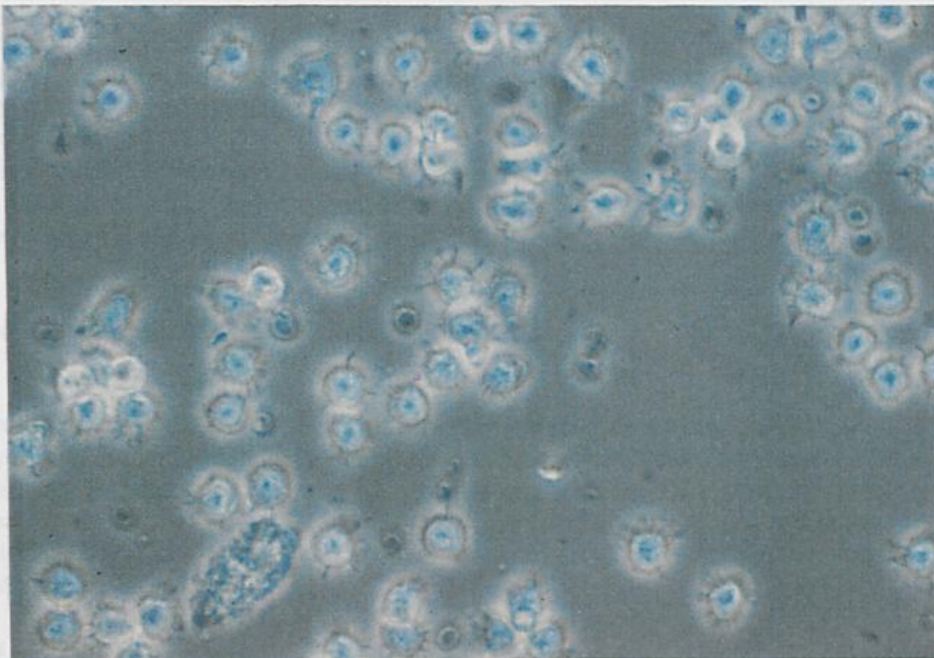


Abb.15. Phasenkontrastmikroskopie von emigrierten kutanen dendritischen Zellen am Boden des Kulturgefäßes. An der Oberfläche der Zellen erkennbar sind kurze Zytoplasmaausstülpungen bzw. kleine dendritische Fortsätze. (x400)

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

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

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

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

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

1. IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

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

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

Ergebnis

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

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

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

Ergebnis

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

1.3. Expression von CD40 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

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

Ergebnis

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

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

1.4. Expression von CD83 auf emigrierten kutanen dendritischen Zellen

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

Ergebnis

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

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

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

Ergebnis

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

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

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

Ergebnis

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

2. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG

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

Ergebnis

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

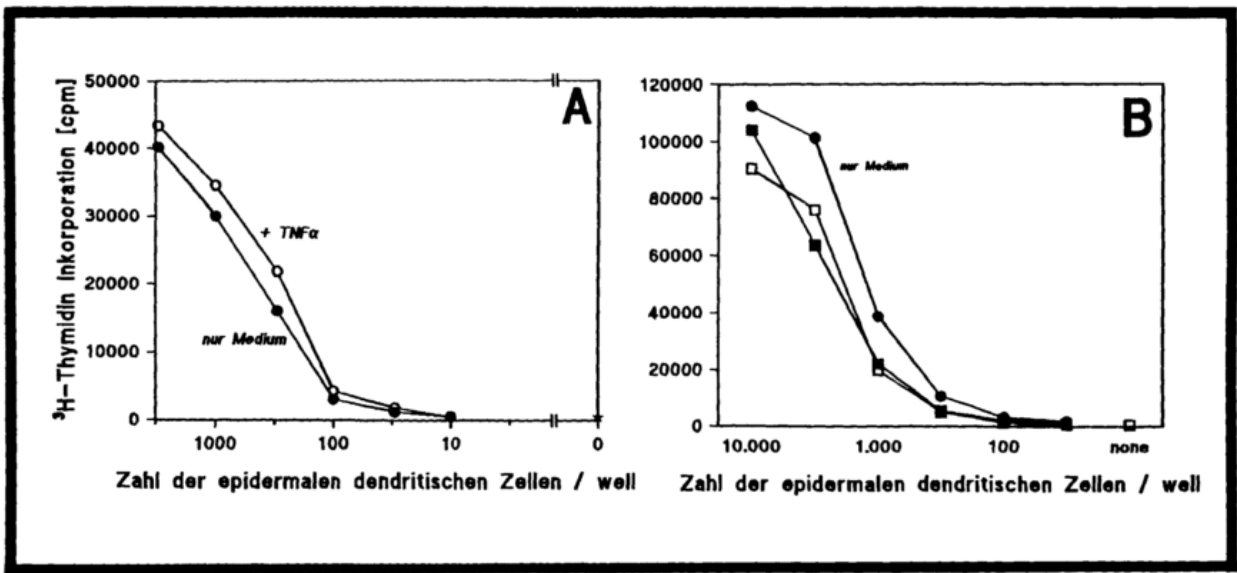


Abb.16. Die "Mixed leukocyte reaction" (MLR) zeigt eine gute immunstimulatorische Kapazität der, während der 48 stündigen Organkultur aus epidermalen "sheets" emigrierten Langerhanszellen.