

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten

Zanella, Monica

1995

2. Ziele und Problemstellung der Arbeit

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12560](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12560)

2. Ziele und Problemstellung der Arbeit

2.1 Optimierung des Organkultursystemes.

Das Organkultursystem, das ich als Grundlage meiner Experimente nahm, wurde von Larsen et al. etabliert und von Ulrike Ortner in diesem Labor weiterentwickelt (101). Es handelt sich hierbei um die Kultur von ganzen murinen Ohrhälften für 1-3 Tage. Dabei wandern dendritische Zellen ins Kulturmedium aus. Die Zellen, sowie das verbleibende Gewebe können morphologisch und immunhistochemisch analysiert werden. Da es sehr schwer ist die Langerhanszellen auf ihrem Weg in den verschiedenen Entwicklungsstufen in vivo zu beobachten und die beobachteten Phänomene zu verifizieren, stellt das Organkultursystem einen Kompromiß zwischen in vivo und in vitro Versuchen dar. So haben schon Larsen et al. murine Ohrhälften auf ein Filterpapier aufliegend in Kulturmedium schwimmen lassen, wobei sie diese Methode von Jenkinson et al. (102) z.T. übernommen hatten. Larsen et al. adaptierten dieses System für Hauttransplantate: Hauttransplantate werden von endogenen Mediatoren beeinflusst im Gegensatz zum Organkultursystem, welches auch von exogen zugeführten Mediatorstoffen gelenkt werden kann. Die Zellen der epidermalen Sheets aus kultivierten Ohrhälften zeigten dieselben phänotypischen Veränderungen (Abnahme der Zellzahl; Verstärkung der MHC Klasse II Expression) wie jene aus Hauttransplantaten, wenn auch in einem verzögerten Zeitverlauf. Auch in den dermalen Sheets fand man nach 3 Tagen Kultur Klasse-II-positive dendritische Zellen, die sich in charakteristischen Strängen (Cords) gesammelt hatten. Martin Heine konnte zeigen, daß sich diese Cords in den Lymphgefäßen befinden und, daß die dendritischen Zellen teilweise aus der Epidermis stammen (103). Im humanem System konnte ein ähnliches Phänomen beschrieben werden (104).

Diese Fakten zeigen, daß das Organkultursystem eine "in vivo-nahe" Möglichkeit darstellt die Migration der Langerhanszellen zu beobachten. Wichtige Mediatorstoffe müssen im Ohr selbst produziert werden, da sonst die spontane Auswanderung in vitro, wie sie in diesen Kulturen beobachtet wird, nicht möglich wäre.

Um nun die verschiedensten und vielfältigen Parameter, die dieses System und dessen Ergebnisse beeinflussen zu minimieren, muß man für die spezifischen

Fragestellungen optimierte Bedingungen anbieten. So versuchte ich, durch die folgenden Vorversuche das Organkultursystem so weit als möglich zu standardisieren:

- 1. Erkennt man Unterschiede in der Langerhanszell-Emigration bei Änderung der Inkubationszeiten? Kann eine Inkubationszeit festgestellt werden, bei der die höchste Rate an ausgewanderten Langerhanszellen erreicht wird?*
- 2. Kann man durch Änderung der "Abliegezeit", die Zeitspanne der Aufbewahrung der unbehandelten murinene Ohren bei 4 °C, eine bessere Differenzierung in der Auswanderung der Langerhanszellen beobachten? Sind die Unterschiede in der Langerhanszell-Zahl bei 30 Stunden Abliegezeit mit und ohne Zytokinhemmer deutlicher als nach 24 Stunden Abliegezeit?*
- 3. Im Regelfall werden ganze Ohrhälften, d.h. Epidermis und Dermis kultiviert: ist es möglich nur die Epidermis getrennt auf das Medium aufzulegen? Gibt es relevante Unterschiede zwischen der Langerhanszell-Auswanderung aus der Epidermis alleine und der gesamten Ohrhaut?*

2.2 Die Rolle von TNF- α und anti-TNF- α bei der Auswanderung der Langerhanszellen

2.2.1 Die Wirkung von TNF- α bei der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen in Organkultur.

Um ein besseres Verständnis der TNF- α Wirkung im meinem System zu vermitteln, möchte ich zunächst einige grundlegende Fakten zur Wirkung des TNF- α in immunologischen Prozessen anführen.

TNF- α ist der wichtigste Botenstoff in der immunologischen Antwort auf Gram-negative Bakterien und könnte somit auch eine wichtige Rolle in der Immunantwort anderer Infektionskrankheiten spielen (54). Die aktive Komponente der Gram-negativen Bakterien ist das LPS, ein Endotoxin, das aus der Bakterienzellwand stammt. Ursprünglich wurde TNF- α als Mediator von Tumornekrosen im Serum von LPS behandelten Mäusen gefunden (105). In niedrigen Konzentrationen stimuliert das LPS die Funktion von mononukleären Phagozyten und wirkt als polyklonaler Aktivator von B-Zellen. Hohe Konzentrationen von LPS verursachen Gewebsschäden und Schocks, die oft mit dem Tod enden.

Die wichtigste zelluläre Quelle für TNF- α sind die mit LPS aktivierten mononukleären Phagozyten. Außerdem können mit Antigen stimulierte T-Zellen, aktivierte Natürliche Killer-Zellen, aktivierte Mastzellen und eine Reihe von Kutanen-Zellen wie z.B. Keratinozyten, dermale dendritische Zellen und Langerhanszellen ebenfalls dieses Protein sezernieren. TNF- α gilt als Mediator sei es der angeborenen als auch der erworbenen Immunität und ist ein wichtiges Verbindungsglied zwischen spezifischer Immunantwort und akuter Entzündung.

In den mononukleären Phagozyten wird TNF- α ursprünglich als nicht glykosiliertes Transmembranprotein von ca. 25 kDa synthetisiert. Die Orientierung von TNF- α ist sehr unüblich: das aminoternale Ende ist intrazellulär, das transmembrane Segment ist in Nähe des aminoterminalen Endes, das Karboxylende liegt extrazellulär.

Die TNF- α Wirkung beginnt mit der Bindung des löslichen Trimers (51 kDa) an den Zelloberflächenrezeptor. Die Struktur des TNF- α Rezeptors ähnelt jener des Rezeptors des Nerven-Wachstums-Faktors (nerve growth factor, NGF), aber nicht anderer Zytokine. Die Affinität des TNF- α für seinen Rezeptor ist für ein Zytokin unüblicherweise niedrig: $K_d = 10^{-9}$ M. Außerdem sind TNF- α Rezeptoren (siehe Kapitel 1.2.4) auf den meisten Zellen vorhanden (auch auf Keratinozyten).

Auch ist bekannt, daß die biologische Aktivität von TNF- α , so wie von LPS, eine Funktion der Quantität ist: in niederen Konzentrationen (ca. 10^{-9} M), agiert das TNF- α lokal als parakriner oder autokriner Regulator von Leukozyten und Endothelzellen; in hohen Konzentrationen von 10^{-7} M verabreicht, verursacht das TNF- α in den Tieren meist über ein schockähnliches Syndrom den Tod.

Die Regulation der TNF- α Produktion wurde im Detail an Zellen der Monocyten/Makrophagen Linie studiert. So beinhalten unbehandelte Zellen undetektierbare oder nur niedrige Levels von TNF- α mRNA, jedoch kein detektierbares Protein. Nach Behandlung mit LPS konnte eine schnelle, aber relativ geringe Zunahme in der transkriptionalen Aktivität, eine Erhöhung des steady-state mRNA Levels und eine Sekretion von großen Mengen an TNF- α Protein nachgewiesen werden (106,107).

Auch andere Agentien können die TNF- α Produktion in Monozyten/Makrophagen in vitro stimulieren: Phorbol myristate acetate (PMA), andere bakterielle Komponenten, Viren, Hefen und Parasiten. Außerdem können auch andere Zytokine die TNF- α Sekretion stimulieren: IFN γ , IL-1, GM-CSF und TNF- α selbst, wenn durch LPS induziert (108,109).

In normaler humaner Haut konnte mittels Immunfluoreszenz-Färbung die Expression von TNF- α in Keratinozyten, aber nicht in Langerhanszellen nachgewiesen werden.; nach UVB-Bestrahlung war die TNF- α Expression erhöht (110).

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß epidermale Langerhanszellen nach Antigenkontakt und Antigenprozessierung die Epidermis verlassen und sich während ihrer Wanderung über die Lymphwege zu reifen dendritische Zellen entwickeln. Einmal in den lymphatischen Organen angekommen, treffen sie auf ruhende T-Zellen und können dort eine primäre Immunantwort einleiten (9,11,49,111). Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß in der Stimulation der Migration von Langerhanszellen Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Es ist nicht klar, welches Zytokin oder welche Kombination von Zytokinen die Auswanderung der Langerhanszellen steuern. Doch gibt es verschiedene Ansätze, daß $\text{TNF-}\alpha$ in diesem Prozeß eine Schlüsselrolle spielen könnte (weiteres dazu siehe 1.2.2). In diesem Kapitel befaße ich mich zunächst mit der $\text{TNF-}\alpha$ induzierten Langerhanszell-Migration.

So gibt es verschiedene Spekulationen über die Mechanismen wie $\text{TNF-}\alpha$ die Migration der Langerhanszellen beeinflussen könnte:

1. Eine These, die in einem späteren Kapitel weiters erklärt wird, beruht auf der Annahme, daß $\text{TNF-}\alpha$ die Synthese von anderen Zytokinen z.B. $\text{IL-1}\beta$ induzieren kann und, daß beide Zytokine zusammen in einer synergistischen Weise auf die Migration der Langerhanszellen wirken. Im Zusammenspiel dieser Zytokine könnte auch GM-CSF in erhöhter Konzentration sezerniert werden und einen positiven Effekt auf die Reifung der Langerhanszellen haben.

2. Ein anderer wichtiger Mechanismus des $\text{TNF-}\alpha$ in der Langerhanszell-Migration, könnte die Steuerung der endothelialen Adhäsionsmoleküle sein. Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß Langerhanszellen in der Epidermis über die E-cadherin-Expression an Keratinozyten gebunden sind (112). In in vitro Studien konnte beobachtet werden, daß während der Langerhanszell-Reifung die Expression dieses Molekül herabreguliert wird, was darauf schließen läßt, daß der Verlust von E-cadherin ein wichtiges Ereignis für die Langerhanszellen ist bevor sie aus der Haut auswandern. Denn durch die Herabregulierung des E-cadherins kann die Bindung zwischen Langerhanszellen und Keratinozyten aufgelöst werden und die Langerhanszellen könnten ihre Migration antreten (112,113)]. Außerdem könnte man sich vorstellen, daß die Expression von weiteren Integrinen eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Langerhanszellen und der Gewebematrix und in der Wanderung der Langerhanszellen durch die Dermis bis zu den regionalen Lymphknoten spielen könnte (114,115). Inwieweit nun $\text{TNF-}\alpha$ die Expression solcher Adhäsionsmoleküle stimulieren könnte wäre noch genau abzuklären.

Ausgehend von einem wichtigen Befund von M.Cumberbatch et al. (83), die nach intradermaler Injektion von $\text{TNF-}\alpha$ eine zeit- und dosisabhängige

Langerhanszell-Migration beobachten konnten, versuchte ich ähnliches im Organkultursystem nachzuvollziehen und stellte die konkrete Frage:

Ist es möglich durch Zugabe von TNF- α - in verschiedenen Konzentrationen eine Änderung in der Langerhanszell-Auswanderungsrate festzustellen? Kann bei steigender TNF- α Konzentration eine vermehrte Auswanderung der epidermalen Langerhanszellen beobachtet werden?

2.2.2 Die Wirkung von intraperitoneal gespritztem anti-TNF- α auf die Langerhanszell-Auswanderung

Umgekehrt versuchte ich mit neutralisierenden Antikörpern die Wirkung von endogen produziertem TNF- α auszuschalten. Da es fraglich ist, ob das direkt in Organkultur zugegebene anti-TNF- α schnell genug an seinen Wirkort d.h. also vom Kulturmedium in die Dermis und Epidermis gelangen kann, wurde der Antikörper intraperitoneal verabreicht und auch der anschließenden Organkultur beigegeben.

Die Möglichkeit durch Verabreichung von anti-TNF- α eine verminderte Langerhanszell-Migration zu beobachten wurde auch von Cumberbatch und Kimber (116) in Betracht gezogen. Nach intradermaler Injektion von TNF- α konnten sie eine Zunahme der dendritischen Zellen in den Lymphknoten und eine Abnahme der Langerhanszell-Dichte in der Epidermis beobachten. Die intraperitoneale Verabreichung von anti-TNF- α reduzierte stark die Frequenz der dendritischen Zellen in den Lymphknoten 18 Stunden nach Hautkontaktsensibilisierung.

Ich stellte mir folgende Fragen:

1. *Ist das gemischte System bestehend aus intraperitonealer Injektion des anti-TNF- α in vivo und anschließender Emigration der epidermalen Langerhanszellen ins Kulturmedium in vitro für die Beobachtung der anti-TNF- α Wirkung geeignet?*
2. *Ändert sich die Langerhanszell-Emigrationsrate in Abhängigkeit von der Zeitspanne nach dem Spritzen und dem Auflegen der Ohrhälften in Organkultur? Kann ich das System dadurch optimieren?*
3. *Wie stark ist der Hemmeffekt des intraperitoneal verabreichten anti-TNF- α auf die epidermale Langerhanszell-Migration in Organkultur?*

2.3 Einfluß von Interleukin-1 β auf die Langerhanszell-Migration.

Zunächst möchte ich einiges zur Funktion und Struktur des IL-1 β ergänzen, um dann ein Modell des Zusammenspiels der Zytokine vorzustellen.

IL-1 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen der unterschiedlichsten Lokalisationen, von Monozyten und auch von peripheren, polymorphkernigen Neutrophilen gebildet. Andere Quellen sind u. a. Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Langerhanszellen, T-Zellen, B-Zellen, Natürliche-Killer Zellen und andere. Die IL-1 Produktion von mononukleären Phagozyten kann durch bakterielle Produkte wie z.B. bei LPS, oder durch von Makrophagen stammende Zytokine wie TNF- α oder IL-1 selbst, oder durch Kontakt mit CD4⁺ T-Zellen getriggert werden.

Es gibt zwei funktionell gleichwertige Hauptformen: IL-1 α und IL-1 β , die von unterschiedlichen Genen codiert werden. Die Hauptmenge des von stimulierten Makrophagen sezernierten Interleukins ist IL-1 β . In der Epidermis wird der Großteil des IL-1 von Keratinozyten gebildet. Sie können jedoch nur IL-1 α sezernieren und nicht IL-1 β (siehe 1.2.4). Beide Proteine haben nur einen geringen Grad an Homologie: IL-1 α aus Kaninchen, Mäuse und Menschen zeigt eine 61-64 %ige Sequenzhomologie auf Aminosäureebene, während IL-1 β in den drei Species eine 27-33 %ige Homologie aufweist.

IL-1 α und auch IL-1 β werden als große Vorläuferproteine gebildet. Die nativen Formen entstehen durch proteolytische Spaltung vor und nach Sekretion. Das IL-1 α Vorläuferprotein ist im Gegensatz zum IL-1 β Vorläuferprotein selbst biologisch aktiv. Es ist noch nicht ganz klar wie das IL-1, dem die hydrophobe Leadersequenz fehlt, aus der Zelle transportiert wird, aber es gibt Hinweise, daß dies über lysosomale Vesikel geschehen kann (117). Es gibt auch Evidenz, daß es einen alternativen Weg zum klassischen Endoplasmatischen Retikulum/Golgi System gibt (118). In humanen mononukleären Zellen bleibt das pro-IL-1 α Vorläuferprotein meistens in einer zellassozierten Form an der Zelloberfläche, während pro- und aktives IL-1 β aus der Zelle ausgeschleust werden (119). Von einigen Arbeitsgruppen wird postuliert, daß das IL-1 α meist nur in einer Zelloberflächen gebundenen Form vorkommt, während lösliches IL-1 aus beiden IL-1 α und IL-1 β besteht (118).

IL-1 α und IL-1 β können auf denselben Zellen wesentlich unterschiedliche Antworten hervorrufen. So binden IL-1 α und IL-1 β an zwei verschiedenen Regionen desselben Rezeptors, wobei das IL-1 α vorwiegend an den IL-1R1 und das IL-1 β an den IL-1R2 bindet (120).

Es ist interessant die Expression der Rezeptoren auf epidermalen Zellen zu beobachten: Keratinozyten exprimieren Rezeptoren für IL-1 (120,121). In der unbehandelten Epidermis werden nur wenige IL-1 Rezeptoren exprimiert. Nach UV-

Bestrahlung oder Trauma jedoch steigt die IL-1R Expression (122). Außerdem können IL-1R auf Keratinozyten auch durch aus T-Zellen stammendem IFN- γ und Phorbol ester induziert werden (120).

IL-1 erhöht die CD4⁺ T-Zell Proliferation und das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen. Ebenso stimuliert das IL-1 eine Reihe von Zellen, die als Effektorzellen für die Immunantwort und für die inflammatorische Antwort zuständig sind. Es ist überraschend wieviele Gemeinsamkeiten IL-1 und TNF- α in ihrer Wirkung aufweisen, doch gibt es auch einige grundlegende Unterschiede:

1. IL-1 verursacht selbst keine Gewebsschäden, sondern es wird in Anwesenheit von LPS produziert und kann die Gewebsschäden über TNF- α erhöhen. Auch bei sehr hohen Dosen wirkt IL-1 nicht lethal so wie TNF- α .
2. Obwohl IL-1 viele inflammatorische Eigenschaften von TNF- α nachahmt, kann es nicht anstelle von TNF- α als Mediator in der Schwartzmann Reaktion wirken.
3. Tumorzelllinien können in vitro nicht direkt von IL-1 lysiert werden.
4. IL-1 besitzt nicht die Fähigkeit die MHC-Expression zu erhöhen.
5. IL-1 scheint ein effektiverer Kostimulator für T-Zellantworten zu sein als TNF- α .

So erkennt man Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen TNF- α und IL-1 β . Aus diesem Grunde könnte IL-1 β ähnliche Wirkungen wie TNF- α auf die Migration von Langerhanszellen haben. Ähnliche Wirkungen von IL-1 β auf die Migration der Langerhanszellen wurden von Nylander-Lundqvist (92) erbracht, die nach intracutaner Injektion von rekombinantem IL-1 β feststellten, daß die Langerhanszell-Dichte nach 2-7 Tagen merklich abnahm. Enk und Katz (58,93) konnten beobachten, daß nach IL1 β Injektion, ähnlich wie nach Kontaktallergenapplikation, die MHC-Klasse-II Expression auf Langerhanszellen anstieg und die Dichte der in der Epidermis zurückbleibenden Langerhanszellen sich deutlich verringerte. Eine Theorie, um die Wirkung beider Zytokine zu erklären, wäre eine mögliche durch TNF- α medierte Induktion der IL-1 β Produktion in Keratinozyten; beide Zytokine gemeinsam könnten die Langerhanszell Migration verstärken. Als drittes Zytokin könnte GM-CSF von Keratinozyten ausgeschüttet die Reifung der Langerhanszellen induzieren. Bei diesem Modell würden jedoch nicht nur die Zytokine eine erhebliche Rolle spielen sondern auch Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-cadherin.

Um diese These bzw. Modell zu bestätigen, eröffnen sich einige Fragen:

1. *Kann man in Organkultur durch Zugabe von rekombinantem, murinem IL-1 β in verschiedenen Konzentrationen eine Auswirkung auf die Langerhanszell-Migration beobachten? Bei welcher Konzentration erzielt man eine*

signifikante Reduktion der Langerhanszellen in der Epidermis bzw. eine erhöhte Auswanderung der Langerhanszellen in das Kulturnedium?

2. *Kann man bei intraperitonealer Verabreichung von rekombinantem, murinem IL-1 β eine erhöhte epidermale Langerhanszell-Auswanderung in Organkultur beobachten?*
3. *Kann man durch gleichzeitige Zugabe von IL-1 β und dessen Antikörper, anti-IL-1 β , den stimulatorischen Effekt der Langerhanszell-Migration durch IL-1 β hemmen?*
4. *Kann man eine zeitliche oder kausale Folge bei der Wirkung von TNF- α , IL-1 β , anti-TNF- α und anti-IL-1 β beobachten?*

2.4 Die Wirkung des CD40-Liganden auf die Viabilität und auf die Auswanderungsrate epidermaler Langerhans-Zellen.

CD40 ist ein integrales Membranprotein, welches auf der Oberfläche von B-Lymphocyten, reifen dendritischen Zellen, follikulären dendritischen Zellen, hämatopoetische Vorläuferzellen, Epithelzellen und z.T. auch von Karzinomzellen exprimiert wird (123). Es ist ein 50 kDa Glykoprotein, welches zur Superfamilie des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors gehört. Das CD40 bindet an seinem Liganden (CD40-L), welcher erst kürzlich identifiziert worden ist: er ist ein 39 kDa Protein, gp39, welches vorwiegend von CD4⁺ T-Helfer Zellen exprimiert wird. In vitro Versuche zeigten, daß lösliches CD40 und anti-gp39 die Fähigkeit der Th-Zellen B-Zellen zu aktivieren blockiert, was auf eine wichtige Interaktion von gp-39 mit CD40 bei der T-Zell abhängigen B-Zell-Aktivierung hinweist (83).

Somit ist das CD40 ein Membrandifferenzierungs-Antigen, welches konstitutiv von B-Zellen exprimiert wird und nach einer Bindung mit einem anti-CD40 mAk oder mit dem CD40-L das B-Zell-Wachstum und die Ig-Synthese induziert. Der CD40-L selbst wird nach Bindung mit einem anti-CD3 mAk oder einem Mitogen rasch auf T-Zellen induziert. Demnach ist die CD40/CD40-L Wechselwirkung für B-Zellen von großer Bedeutung (124), aber es gibt ebenso Spekulationen, daß der CD40-L eine wichtige Rolle als akzessorisches Molekül in der Regulation der T-Zell Aktivierung und Funktion spielt, also in der T-T-Zell-Interaktion wichtig ist (125). Ein Modell wie man sich die Interaktionen zwischen DC-Zellen und T-Zellen über eine CD40/CD40-Liganden Wechselwirkung vorstellen könnte und dessen Folgen, ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

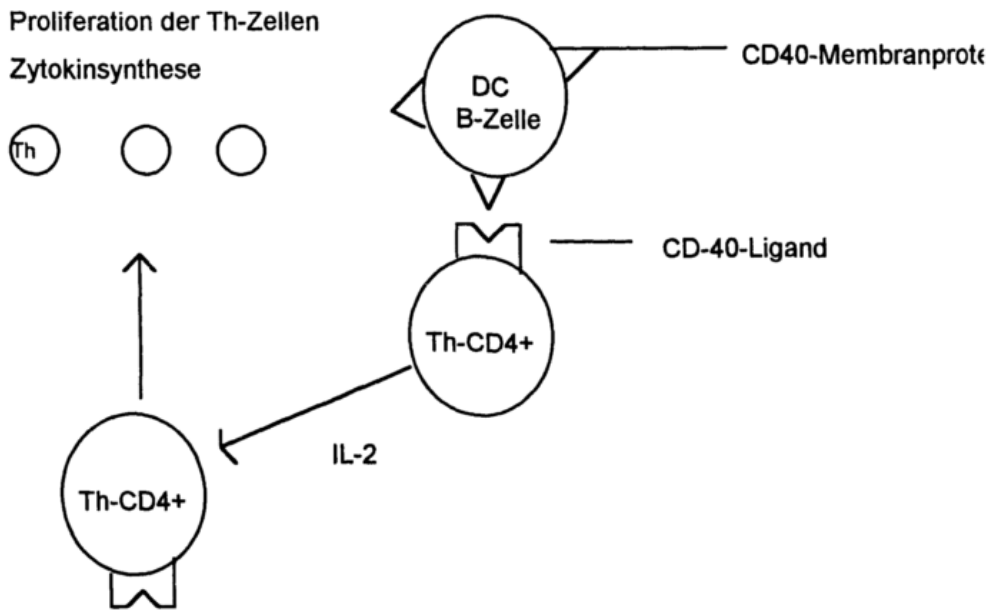


Abb.3.5: Modell zur Wechselwirkung des CD40/CD40-Liganden Komplexes.

Die Kommunikation zwischen T-Zellen und anderen Zellen des hämatopoetischen Systems wird über Zelloberflächen Rezeptoren und ihren dazupassenden membrangebundenen Molekülen vermittelt (124). So wird bei der Aktivierung und klonalen Expansion von T-Zellen nicht nur die Interaktion zwischen T-Zellrezeptor (TCR) und dem im MHC-Komplex assoziiertem Antigen benötigt, sondern auch kostimulatorische Signale, die gleichzeitig als akzessorische Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden. Einige solcher Rezeptorpaare, die die Aktivierung über den TCR-Komplex-Weg erleichtern, wurden identifiziert. Es sind solche kostimulatorische Moleküle bekannt, die in vielen Geweben weit verstreut vorkommen, wie z.B. CD58-LFA-3, CD45-ICAM-1, und andere wenige, die meist nur im Zusammenhang mit Zelltypen stehen, die Antigen präsentieren wie z.B. Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen.

Ein charakteristisches Beispiel dafür wäre das B7/BB1-Molekül, ein membrangebundenes Glycoprotein, welches hauptsächlich von dendritischen Zellen, Makrophagen und aktivierten B-Zellen exprimiert wird (126-128) und an das CD28 bindet, welches als Rezeptor von den meisten T-Lymphozyten exprimiert wird. Diese Wechselwirkung zwischen CD28 und B7/BB1 steigert die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion(129).

Aus neueren Studien ist bekannt (130), daß der Rezeptor für das B7-Molekül nicht nur aus dem CD28-Molekül besteht, sondern aus einem eng verwandten interzellulären Adhäsions/Kostimulator Rezeptor (CD28/CTLA4), der von T-Zellen exprimiert wird. Es gibt einige Evidenz, daß es im murinen und im humanen System vielfache CTLA4-Rezeptoren auf APC gibt, die die T-Zellproliferation und die IL-2

Produktion kostimulieren (30,46,47,49,52,90). Es wurde gezeigt, daß lymphoide dendritische Zellen konstitutiv das Molekül B7-1/CD80 exprimieren. Langerhanszellen in situ exprimieren jedoch den CTLA4-Rezeptor nicht, sondern erst während ihrer Reifung zu potenten T-Zell-Stimulatoren (42,130). Das könnte darauf hindeuten, daß lokal produzierte Mediatoren für Migration und funktionelle Reifung, wie etwa GM-CSF und TNF- α , auch die CTLA4-Rezeptor Expression regulieren.

1. Meine erste Fragestellung in diesem Zusammenhang beschäftigt sich mit der Möglichkeit, ob durch Zugabe des CD40-Liganden in eine dendritische Zellsuspension, bestehend aus epidermalen, d2 ausgewanderten Langerhanszellen, eine erhöhte Viabilität der dendritischen Zellen beobachtet werden kann. Es ist bekannt, daß nach Kultivierung (2-3 Tage) einer epidermalen Zellsuspension mit GM-CSF sei es die Viabilität als auch die T-Zell aktivierende Funktion der Langerhanszellen gesteigert wird und, daß bei Zugabe von TNF- α ebenso die Viabilität erhöht wird, die funktionelle Reifung jedoch nicht beeinflußt wird (88). In anderen Versuchsreihen wurde gezeigt, daß die Inkubation für 24 h von kultivierten dendritischen Zellen mit TNF- α oder mit löslichem CD40-Ligand eine erhöhte Oberflächenexpression von MHC Klasse I und II Molekülen, B7-1 und ICAM-1 zur Folge hat. Als funktionelle Konsequenz dieses kurzen Kontaktes mit TNF- α ist eine erhöhte T-Zell stimulatorische Kapazität in der MLR, aber eine um das 10-fache niedrigere Präsentation von löslichem Antigen und eine 100-fach niedrigere Präsentation des Antigen-Antikörper Komplexes (131) zu beobachten.

Da nun das CD40-Membranprotein der TNF- α -Rezeptor Superfamilie angehört und somit im molekularem Aufbau dem TNF- α -Rezeptor sehr ähnlich ist, könnte die Zugabe des löslichen CD40-Liganden eine ähnliche Wirkung auf die Viabilität von dendritischen Zellen haben wie das zuvor besprochene TNF- α (88).

2. Gleich daran möchte ich meine zweite Fragestellung anschließen: da TNF- α die Auswanderung epidermaler Langerhanszellen in Organkultur stimuliert, wäre es möglich, daß die Wechselwirkung von CD40-CD40-L ähnliches hervorruft. Außerdem ist bekannt, daß die Behandlung von humanen endothelialen Zellen mit einem rekombinanten murinen CD40-Liganden die Expression von E-selectin, VCAM-1 und ICAM-1 erhöht (132). Die erhöhte Expression solcher Adhäsionsmoleküle könnte einen weiteren Stimulus bzw. Kostimulus in der Initiation der Migration darstellen.