universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten

Zanella, Monica

1995

4. Experimente und Ergebnisse

urn:nbn:at:at-ubi:2-12560

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Optimierung des Organkultursystems.

4.1.1 Optimierung der Inkubationszeiten

Anhand dieser Versuche wurde untersucht, ob es eine Inkubationszeit gibt, bei der die Auswanderungsrate der kutanen dendritischen dendritischen Zellen hoch ist und deren Anteil an der Gesamtzellzahl dennoch mindestens 70 % beträgt. Einerseits wurde das "weitergezogene System" [von U. Ortner(101)] getestet, bei dem die Ohren nach den ersten 24 Stunden auf neues Medium übertragen werden und wiederum für 24 Stunden inkubiert werden, andererseits wurden Inkubationszeiten von 30 Stunden und 48 Stunden getestet. Gleichzeitig wurde bei jedem Versuchsansatz die Ohren parallel auf R10-Medium und auf R10 mit 1000 U/ml TNF–α supplementiert inkubiert, um einen möglichen Einfluß von TNF–α auf die Auswanderung zu beobachten.

Die Ergebnisse dieser Versuchsansätze werden in der folgenden Tabelle 4.1.1 gezeigt, wobei beim letzten Versuchsansatz auch die Wirkung von anti-TNF–α getestet wird.

Tabelle 4.1.1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei verschiedenen Inkubationszeiten im Organkultursystem mit und ohne Zugabe von 1000 U/ml TNF–α.

		Gesamt	Viabel	DC	% DC
A	24 h:do-d1				
	R10 (Kontrolle)	7083	7083	5833 (100%)	82
	TNF–α	3000	3000	2500 (42%)	83
B	**24 h: d1-d2**				
	R10 (Kontrolle)	8125	7083	5833 (100%)	71
	TNF–α	8250	8000	7250 (124%)	87
C	**30 h: d0-d1**				
	R10 (Kontrolle)	8333	8125	7708 (100%)	92
	TNF–α	10208	9791	6875 (89%)	67
D	**48 h: d0-d2**				
	R10 (Kontrolle)	12916	12500	9375 (100%)	72
	TNF–α	7708	6875	4791 (51%)	62
	anti-TNF	5208	4583	4583 (48%)	87

Legende: Mausstamm: C57bl, weiblich; Abliegezeit: 24 h; Inkubationszeiten: 24 h, 30h, 48 h; TNF-α Konzentration: 1000 U/ml, anti-TNF-α Konzentration: 0,3 mg/ml. Methode: Organkultursystem siehe 3.2.1. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Nach einem Vergleich der Ergebnisse bei verschiedenen Inkubationszeiten, findet man die höchste Auswanderungsrate an kutanen dendritischen Zellen nach 48 Stunden Inkubation. Zudem sind die kutanen dendritischen Zellen nach dieser Inkubationszeit am besten ausdifferenziert, d.h. daß die "veils" gut und leicht erkenntlich ausgeprägt sind, sodaß die Zählung und Unterscheidung am klarsten ausfällt. Außer der dendritischen Zellen befanden sich auch Makrophagen und vorwiegend Lymphozyten in Suspension. Häufig sind Lymphozyten mit den ausgewanderten dendritischen Zellen assoziert. Auch konnte man den Einfluß von TNF–α und anti-TNF–α hier ansatzweise beobachten. Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigten sowohl TNF-α (mit einer Ausnahme) als auch anti-TNF-α eine hemmnde Wirkung.

Aus diesen Gründen wurden in den folgenden Experimenten die Ohren für 48 Stunden bei 37°C und 5%CO_2 inkubiert.

4.1.2 Optimierung der Abliegezeiten

Schon meine Vorgängerin U. Ortner konnte beobachten, daß nach einer Abliegezeit (d.h. der Zeit zwischen dem Abschneiden der Ohren und dem Beginn der Kultur) der Ohren bei 4°C für 20-30 Stunden, die Zugabe von Zytokinen und Anti-Zytokinen einen erhöhten Einfluß auf die Migration der kutanen dendritischenZellen aus der Epidermis hatte. Wärend dieser Abliegezeit könnte die endogene Zytokinproduktion abflachen oder sogar eingestellt werden, da die Zytokinsekretion nur ein Prozeß von kurzer Dauer ist, der sich selbst limitiert (siehe 1.3.1). So könnte es möglich sein, daß durch eine darauffolgende exogene Zugabe von Zytokinen oder Anti-Zytokinen die Migration der kutanene dendritischen Zellen induziert werden könnte.

Im folgenden Versuch (Ergebnisse siehe Tabelle 4.1.2) wird getestet wie hoch die Auswanderungsrate nach Abliegezeiten von 24 und 30 Stunden ist und wie sich der Unterschied in der Zellzahl zwischen der Inkubation auf R10 mit und ohne anti-TNF–α verhält.

Tabelle 4.1.2: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei verschiedenen Abliegezeiten im Organkultursystem.

24 Stunden	**Gesamt**	**DC**	**% DC**
R10 (Kontrolle)	12916	10208	100
anti-TNF–α	13541	8958	87
30 Stunden			
R10 (Kontrolle)	16250	13083	100
anti-TNF–α	7500	5250	40

Legende: Mausstamm: C57bl; Abliegezeiten: 24h, 30h; Inkubationszeiten: 48h; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Bei einer Abliegezeit von 30 Stunden bei 4°C erhält man eine höhere Auswanderungsrate als nach 24 Stunden Abliegezeit, und auch die Hemmung der Migration der kutanen dendritischenZellen bei Zugabe von anti-TNF–α war nach 30 Stunden sehr deutlich (nur 40 % kutanen dendritischenZellen der bei R10 ausgewanderten). Nach 24 Stunden war der Unterschied zwischen R10 und anti-TNF–α Inkubation kaum erkennbar (87 % bei anti-TNF–α Zugabe, 100 % bei R10). Auf Grund dieser Daten führte ich die folgenden Experimente meist mit einer Abliegezeit von 26 Stunden durch.

4.1.3 Versuche zur Organkultur der Epidermis.

Um eine mögliche differentielle Regulation der Wanderung den einzelnen Kompartimenten der Haut im Vergleich zum Gesamthautsystem untersuchen zu können, wurden reine Epidermis bzw. Dermis Kulturen durchgeführt.

⇗ Versuchsansatz 1:

Im folgenden Versuch wird die Trennung von Epidermis und Dermis mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt: Dispase- und Trypsinmethode (siehe 2.2.6). Anschließend werden sowohl die Epidermis als auch die Dermis auf R10 inkubiert und die Auswanderungsrate der kutanen dendritischenZellen (siehe Tabelle 4.1.3/1) beobachtet.

Tabelle 4.1.3/1: Auswanderung von kutanen dendritischenZellen aus Epidermis oder Dermis: ein Vergleich zwischen Dispase- und Trypsinmethode.

Dispasemethode	Gesamt	Viabel	DC
Epidermis	19790 (100 %)	15830 (80 %)	15210 (76 %)
Dermis	16460 (100 %)	11460 (69 %)	2920 (17 %)
Trypsinmethode			
Epidermis	466670 (100 %)	58330 (12 %)	20830 (4,4 %)
Dermis	32080 (100 %)	11040 (34 %)	7920 (24 %)
Kontrolle ganze Haut	7260 (100 %)	5210 (36 %)	4370 (64 %)

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Abliegezeit: keine; Inkubationszeit: 48 Stunden. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Die Prozentwerte geben den Anteil der kutanen dendritischenZellen an der Zahl der Gesamtzellzahl an.

Man erkennt deutlich, daß bei der Trennung von Dermis und Epidermis mit der Dispasemethode eine aktive Wanderung der epidermalen Langerhanszellen aus der Epidermis in das Medium R10 stattgefunden hat. Zwischen 70-80 % der ausgewanderten Zellen sei es aus der Dermis als auch aus der Epidermis waren viabel. Der Anteil an ausgewanderten Langerhanszellen aus der Epidermis (76 %) an der Gesamtzellzahl ist vergleichsweise gleich hoch wie der Anteil der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen aus der ganzen Haut (64 %). Der prozentuelle Anteil der ausgewanderten demalen Langerhanszellen aus der Dermis ist jedoch sehr gering (17 %), wobei schon die absolute Zellzahl deutlich geringer ist.

Bei der Trennung von Dermis und Epidermis mittels der Trypsinmethode findet keine aktive Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis statt: nur 12 % der Gesamtzellen waren viabel, von denen wiederum nur 4,4 % Langerhanszellen waren. Das weist darauf hin, daß -wie zu erwarten war- durch das Trypsin der Zellverband enzymatisch aufgelöst worden ist und die meisten Zellen tot ins Medium gelangt sind.

Bei der Dermis war die Gesamtzellzahl um eine Zehnerpotenz niedriger, der Langerhanszellen-Anteil jedoch etwas höher (24 %) als bei der Epidermis.

Aus diesen Ergbnissen ist ersichtlich, daß die Trennung von Dermis und Epidermis mittels der Dispasemethode die für die Organkultur mildere und geeignetere Variante darstellt.

⇗ Versuchsansatz 2:

Weiters wollte ich den Einfluß von Zytokin (TNF–α) und Anti-Zytokin (anti-TNF–α) auf das Migrationsverhalten von kutanen dendritischen Zellen aus der Epidermis (siehe Tabelle 4.1.3/2) unter Standardbedingungen beobachten.

Tabelle 4.1.3/2: Ein Vergleich der Langerhans Zell-Auswanderungsrate aus der Epidermis bei Zugabe von TNF–α und anti-TNF–α.

	Gesamt	Viabel	DC	%DC
R10 Kontrolle	7700	5620	5000	100
TNF–α	9790	7080	6870	137
anti-TNF–α	6870	5200	6660	133

Legende: Mausstamm: C57bl, weiblich; Abliegezeit: keine; Inkubationszeit: 48 Stunden, TNF-a Konzentration: 100 U/ml, anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Methode: Dispase; Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Bei der Zugabe von anti-TNF–α findet wider Erwarten keine Hemmung der Migration der kutanen dendritischen Zellen sondern eine Steigerung aus der Epidermis statt genauso wie bei Zugabe von TNF–α.

⇗ Versuchsansatz 3:

Eine weitere Frage stellt das Migrationsverhalten der Langerhanszellen aus der Epidermis im "weiter gezogenen" System bei Ab-oder Anwesenheit von anti-TNF–α dar. Dazu vergleiche ich die Auswanderungsrate der Langerhanszellen aus der Epidermis mit der aus der Gesamthaut (siehe Tabelle 4.1.3/3).

Tabelle 4.1.3/3: Langerhanszell-Auswanderungsrate im modifizeirten ("weiter gezogenen") System mit und ohne anti-TNF–α vergleichend bei gesamter Haut und Epidermis.

Epidermis	Gesamt	DC	% DC
R10 d0-d1	10620	9160	100
ant-TNF–α d0-d1	4160	3540	38
R10 d1-d0	7080	6040	100
anti-TNF–α d1-d2	9580	8330	137
ganze Haut			
R10 d0-d1	11250	6870	100
anti-TNF–α d0-d1	8540	3750	54
R10 d1-d2	15340	11800	100
anti-TNF–α d1-d2	7910	6250	53

Legende: Mausstamm: BALB/c, männlich, Abliegezeit: keine; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Inkubationszeit: 24h + 24h; Methode: Dispase. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Abkürzungen: d0 = Tag 0, d1 = Tag1 usw.

Bei der Inkubation der Epidermis kann keine eindeutige Hemmung in der Auswanderung der Langerhanszellen bei Zugabe von anti-TNF–α beobachtet werden, anders hingegen bei der gesamten Haut, wo eindeutig sei es von d0 auf d1 als auch von d1 auf d2 eine Hemmung der Migration der kutanen dendritischen Zellen durch anti-TNF–α beobachtet werden kann: in beiden Fällen ca. um 47 %.

Da nach der Dispasebehandlung die Epidermis meist nur stückchenweise von der Dermis getrennt und somit auch kaum die gesamte Fläche auf das Medium aufgelegt werden kann, ist die Rückrechnung von der gezählten Zellzahl auf die Zellzahl pro Ohrhälfte sehr schwierig bzw. kaum möglich. Dies könnte teilweise auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei Zugabe von anti-TNF–α erklären.

⇗ Versuchsansatz 4:

Schließlich soll der Einfluß von anti-TNF–α auf die Migration der kutanen dendritischen Zellen im "weiter gezogenen" System nach einer Abliegezeit von 24 Stunden bei 4°C getestet werden (siehe Tabelle 4.1.3/4). Durch die Abliegezeit könnte sich das Phänomen der Hemmung der Migration durch anti-TNF–α in der Epidermis wie schon in Versuch 4.1.2 in der gesamten Haut verstärken.

Tabelle: 4.1.3/4: Langerhanszell-Auswanderungsrate im modifizierten ("witer gezogenen) System nach 24-stündiger Abliegezeit mit und ohne anti-TNF-α.

Epidermis	**Gesamt**	**DC**	**% DC**
R10 d0-d1	7000	6250	100
anti-TNF–α d0-d1	8750	6500	96
R10 d1-d2	7000	6000	100
anti-TNF–α d1-d2	10250	7250	120

Legende: Mausstamm: BALB/c; Abliegezeit: 24h; Inkubationszeit: 24h +24h.

Wie das Ergebnis zeigt, kann anti-TNF-α keine Hemmung der Emigration aus der Epidermis bewirken.

Zusammenfassend sind die Parameter für das von mir gebrauchte Organkultursystem wie folgt festgelegt und werden, wenn nicht anders beschrieben, in den weiteren Experimenten auch derart beibehalten:

Abliegezeit (d.h. Zeit zwischen dem Abschneiden der Ohren und dem Auflegen auf Kultur) :	26 Stunden
Inkubationszeit (d.h. tatsächliche Dauer der Kultur) :	48 Stunden
Volumen des Mediums:	1,5 ml

4.2 Die Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen in Organkultur ist ein TNF–α konzentrationsabhängiger Vorgang.

4.2.1 Änderung der TNF–α Konzentration im Organkultursystem (Einzelexperimente)

⇗ Versuchsansatz 1:

Um einen möglichen Einfluß von TNF–α auf das Migrationsverhalten der Langerhans-Zellen im Organkultursytem zu untersuchen, versuchte ich zunächst, TNF–α in verschiedenen Konzentrationen und auch anti-TNF–α dem Medium zuzugeben (siehe Tabelle 4.2.1). Ich erwartete mir mit steigender TNF–α Konzentration eine steigende Auswanderungsrate der Langerhanszell-Zahl und bei Zugabe von anti-TNF–α eine Hemmung der Auswanderung.

Tabelle 4.2.1/1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei verschiedenen TNF–α Konzentrationen und bei anti-TNF–α im Organkultursystem.

Experiment 1	Gesamt	DC	Andere	% DC
R10 Kontrolle	15208	10625	4531	100
TNF–α 100 U/ml	20208	16875	3263	158
TNF–α 1000U/ml	8194	4583	3541	43
TNF–α 10000U/ml	8611	4791	3819	45
anti-TNF–α	12013	8750	3194	82

Legende: Mausstamm: BALB/c, männlich; Abliegezeit: 26h; Inkubationszeit: 48h; TNF–α Konzentrationen: 100 U/ml, 1000 U/ml, 10000 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: O.3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Wider Erwarten beobachtete ich bei der geringsten TNF–α Konzentration (100 U/ml) eine um 58 % erhöhte und bei höheren Dosen von TNF–α (1000 U/ml und 10000 U/ml) eine bis zu 57 % niederere Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen. Auch die Zugabe von anti-TNF–α zeigte, wenn auch schwächer, eine Hemmung in der Langerhanszell-Auswanderung.

⇗ Versuchsansatz 2:

Im nächsten Schritt versuchte ich die TNF–α Konzentrationen feiner zu dosieren, um die Abhängigkeit der Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen von der TNF-α Konzentration besser herauszuarbeiten (siehe Tabelle 4.2.1/2a). Außerdem versuchte ich TNF–α im Überschuß gemeinsam mit anti-TNF–α zu geben, um eine mögliche Aufhebung des Stimulationseffekts von TNF–α zu erzielen.

Tabelle 4.2.1/2a: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen bei Zugabe verschiedener TNF–α-Konzentrationen, anti-TNF–α und anti-TNF–α/TNF–α - Gemisch.

Experiment 2	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**% DC**
R10 Kontrolle	22250	9000	13410	100
TNF–α 50 U/ml	21580	13750	7910	152
TNF–α 100U/ml	21500	9500	12330	105
TNF–α 500U/ml	10410	4250	6250	47
TNF–α 1000U/ml	8250	3250	5910	36
anti-TNF–α	7160	3250	4000	36
TNF–α 100U/ml + anti-TNF–α	15830	9250	6580	102

Legende: Mausstamm: BALB/c, männlich; Abliegezeit: 26h; Inkubationszeit: 48h; TNF–α Konzentrationen: 50 U/ml, 100 U/ml, 500 U/ml, 1000 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Es bestätigte sich der vorhergehende Versuch: niedere TNF–α Konzentrationen induzieren eine verstärkte Migration der kutanen dendritischen Zellen und anti-TNF–α (0,3 mg/ml) bewirkt eine Hemmung. Es zeigte sich auch, daß durch Zugabe von 100 U/ml TNF–α die hemmende Wirkung von 0,3 mg/ml anti-TNF–α aufgehoben wird.

Als Kontrolle färbte ich immunohistochemisch die epidermalen Sheets (siehe Tabelle 4.2.1/2b), um zu überprüfen, ob die in der Epidermis zurückgebliebenen Langerhanszellen mit der Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen korrelieren, also: bei einer hohen Auswanderungsrate müßte die Zahl der zurückgebliebenen Zellen niedrig sein und bei einer niederen Auswanderungsrate hoch.

Tabelle 4.2.1/2b: Immunhistochemische Färbung der epidermalen Sheets nach 48 Stunden Inkubation.

Experiment 2	**AK-Färbung**	**semi-quantitative Bewertung**	**Morphologie**	**ausgewanderte DC-Zahlen im Vergleich**
Sheet vor Kultur	B21/2	+++	netzartiges Muster	
R10 Kontrolle	B21/2	++	normal	9000
	TIB 93	-		
TNF–α 50U/ml	B21/2	+	groß + rund	13750
TNF–α 100U/ml	B21/2	+	groß + rund	9500
TNF–α 500U/ml	B21/2	+ +	klein + schmal	4250
TNF–α 1000U/ml	B21/2	+ +	diffus	3250
anti-TNF–α	B21/2	+ /++	normal	3250
anti-TNF–α + TNF–α 100U/ml	B21/2	+ /++	normal	9250

Legende: +++ Langerhanszellen netzartig verteilt; ++ einige ausgewanderte Langerhanszellen; + ziemlich ausgewanderte Langerhanszellen; --- keine Langerhanszellen. Zur Färbung wurden die Antikörper B21/2 (anti-MHC Klasse II) und TIB 93 (Negativkontrolle) verwendet. Zur Auswertung der Sheets wurde eine semi-quantitative Methode angewandt.

Die Langerhanszell-Zahl in den epidermalen Sheets stimmt überein mit der Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen in das Medium. In den Fotos 1a-d ist die Langerhanszell-Verteilung vor und nach 48 Stunden Inkubation ohne (d.h. R10 Kontrolle) und mit TNF–α (50 U/ml und 1000 U/ml) gezeigt.

Versuchsansatz 3:

Im nächsten Versuchsansatz verringerte ich die TNF–α Dosis bis auf 25 U/ml, behielt die restlichen TNF–α Konzentrationen von 50 U/ml, 100 U/ml und 1000 U/ml bei, ebenso wie die Zugabe von 0,3 mg/ml anti-TNF–α und dem 0,3 mg/ml anti-TNF–α + 100 U/ml TNF–α Gemisch (siehe Tabelle 4.2.1/3).

Tabelle 4.2.1/3: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen bei Zugabe verschiedener TNF–α-Konzentrationen, anti-TNF–α und anti-TNF–α + TNF–α - Gemisch.

Experiment 3	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**% DC**
R10 Kontrolle	23500	13750	9830	100
TNF–α 25U/ml	30250	23750	6500	172
TNF- α 50U/ml	32330	25750	6500	187
TNF–α 100U/ml	27000	20500	6580	149
TNF–α 1000U/ml	12333	5750	6500	41
anti-TNF–α	14750	9000	5500	65
anti-TNF–α + 100 U/ml TNF–α	18666	13000	5500	94

Legende: Mausstamm: BALB/c, männlich; Abliegezeit: 26h; Inkubationszeit: 48h; TNF–α Konzentrationen: 25 U/ml, 50 U/ml, 100 U/ml; 1000 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: 0,3mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Auch noch mit einer Dosis von 25 U/ml TNF–α erhielt ich eine Stimulation der Migration kutaner dendritischer Zellen (172%), doch ist sie vergleichsweise gleich hoch wie bei 50 U/ml TNF–α (187 %). So scheint es, daß ich mit 50 U/ml TNF–α die maximale Stimulation für die kutanen dendritischen Zellen zur Auswanderung geben kann. Zudem konnte ich in diesem Versuch wieder die Stimulation durch 100 U/ml TNF–α mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml anti-TNF–α aufheben. Die Auswanderungsrate war fast gleich hoch (94 %) wie ohne Zugabe von Zytokin oder anti-Zytokin (100 %).

⇗ Versuchsansatz 4:

In diesen Versuchen wurden wie in den vorhergehenden Experimenten die TNF–α Konzentrationen variiert und wiederholt: 50 U/ml, 100 U/ml und 1000 U/ml (siehe Tabelle 4.2.1/4a).

Tabelle 4.2.1/4a: Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen in Anwesenheit von verschiedenen TNF–α Konzentrationen.

	Gesamt	DC	Andere	% DC
R10 (Kontrolle)	23830	12500	11330	100
TNF-a 50 U/ml	20000	15000	5000	120
TNF-a 100 U/ml	19000	14000	5000	112
TNF-a 1000U/ml	6660	1830	4830	14

Legende: Mausstamm: BALB/c, männlich; Abliegezeit: 24h; Inkubationszeit: 48h, TNF–α Konzentrationen: 50 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Wiederum hat sich die Stimulation der Migration der kutanen dendritischen Zellen durch 50 U/ml und 100 U/ml TNF–α bestätigt. Im folgendem Versuch (siehe Tabelle 4.2.1/4b) wurde sowohl die Induktion durch TNF–α als auch die Hemmung durch anti-TNF–α der Migration der kutanen dendritischen Zellen im Organkultursystem geprüft.

Tabelle 4.2.1/4b: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Stimulation (TNF–α) und Hemmung (anti-TNF–α) der Migration im Organkultursystem.

Experiment 4	Gesamt	DC	Andere	%DC
R10 (Kontrolle)	11205	5000	6250	100
TNF- a 50U/ml	10830	9160	1660	183
TNF–α 100U/ml	11580	8420	3160	168
TNF–α 1000U/ml	4580	2000	2580	40
0,3 mg/ml anti-TNF–α	3200	2400	800	48
0,3 mg/ml anti-TNF–α + 100 U/ml TNF–α	12700	4800	7900	96

Legende: Mausstamm: BALB/c, Abliegezeit: 26 h; Inkubationszeit: 48h; Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

4.2.2 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.

Bei allen Versuchen wurden die Versuchsbedingungen (siehe Legende) gleichgelassen, damit ein Vergleich innerhalb der Experimente gezogen werden kann. Die Tabelle 4.2.2/1 zeigt die konzentrationsabhängige Induktion der Migration kutaner dendritischer Zellen: bei Dosen zwischen 50 U/ml und 100 U/ml findet eine Stimulation statt, bei höheren Konzentrationen eine Hemmung der Migration.

Tabelle 4.2.2/1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei verschiedenen TNF–α -Konzentrationen.

Exp. Nr.	R10	TNF–α 50 U/ml	TNF–α100 U/ml	TNF–α1000 U/ml
[Exp.1]	[100]	/	[158]	[43]
Exp.2	100	152	105	47
Exp.3	100	187	149	41
Exp.4a	100	120	112	14
Exp.4b	100	183	168	40
Mittelwert	100	160 (+/- 31)	133 (+/- 30)	35 (+/- 14)

Legende: Mausstamm: BALB/c; Abliegezeit: 26h; Inkubationszeit: 48h; TNF–α Konzentrationen: 50 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml. Die Auswanderungsrate bei R10 wurde als 100 % betrachtet; Standardabweichung in Klammer().

In der Tabelle 4.2.2/2 wird die Stimulation der Migration kutaner dendritischer Zellen durch TNF–α und dessen Aufhebung durch anti-TNF–α gezeigt.

Tabelle 4.2.2/2: Hemmung der Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen

Exp. Nr.	R10	anti-TNF–α	anti-TNF–α+ 100 U/ml TNF–α
Exp.1	100	82	
Exp.2	100	36	102
Exp.3	100	65	94
Exp.5	100	48	96
Mittelwert	100	49 (+/- 14)	97 (+/- 4)

Legende: Mausstamm: BALB/c; Abliegezeit: 26h; Inkubationszeit: 48h; TNF–α Konzentration: 100 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Auswanderungsrate bei R10 wurde als 100 % betrachtet; Standardabweichung in Klammer().

Die Abb. 4.2.1 faßt die in Tabelle 4.2.2/1 und 4.2.2/2 Werte zusammen:

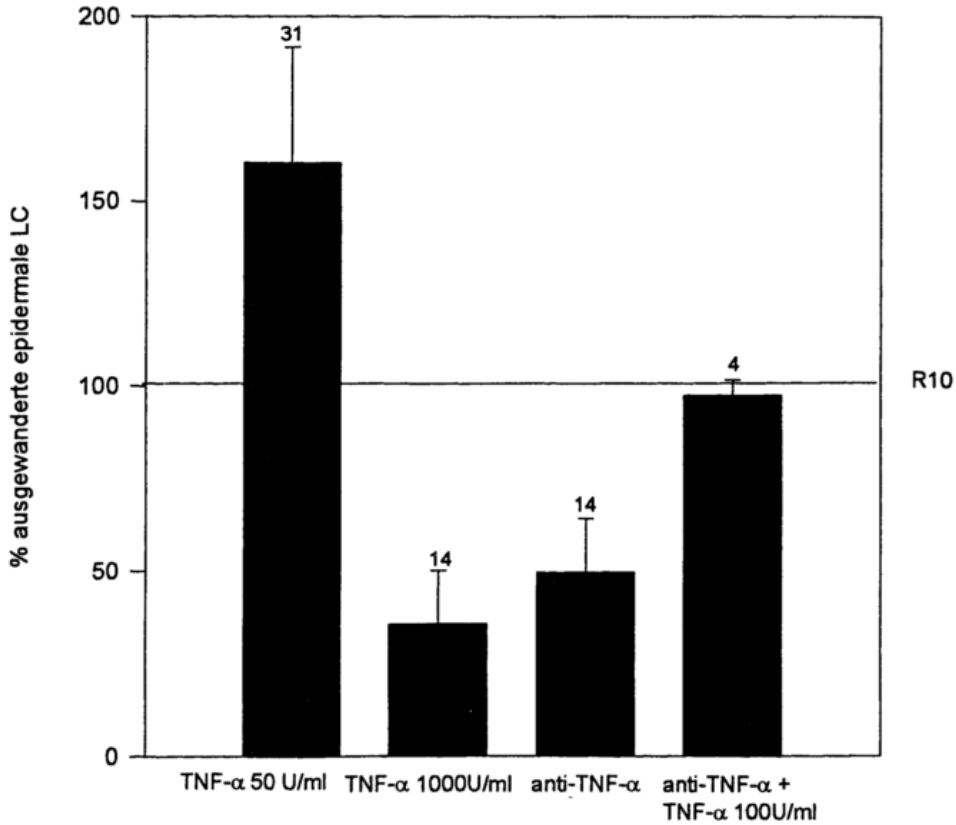

Abb 4.2.2: Die Emigration kutaner dendritischer Zellen ist ein TNF–α konzentrationsabhängiger Prozeß: 50 U/ml stimulieren die Auswanderung. 1000 U/ml hemmen die Auswanderung. Die hemmende anti-TNF–α Wirkung kann durch 100 U/ml TNF–α aufgehoben werden. (n= 5)

Wie aus der Tabelle 4.2.2/2 ersichtlicht und in der Abb. 4.2.2 dargestellt ist, kann durch Zugabe von anti-TNF–α die Migration der kutanen dendritischen Zellen um 50 % inhibiert werden. Zwischen den einzelnen Experimenten doch einige Differenzen liegen, so beträgt der Prozentsatz der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe von anti-TNF–α in Experiment 1 noch 82 % hingegen in Experiment 2 nur 36 %. Das weist darauf hin, daß das hier verwendetet System noch großen Schwankungen unterliegt. So versuchte ich die Hemmung der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen durch anti-TNF–α in einem in vivo/in vitro System, wie es im folgendem Kapitel beschrieben wird.

Foto 1a: Typisches Langerhanszell-Muster eines unbehandelten epidermalen Sheets. Immunohistochemische Färbung gegen MHC-Klasse II (B21/2) bei einer 500 x Vergrößerung.

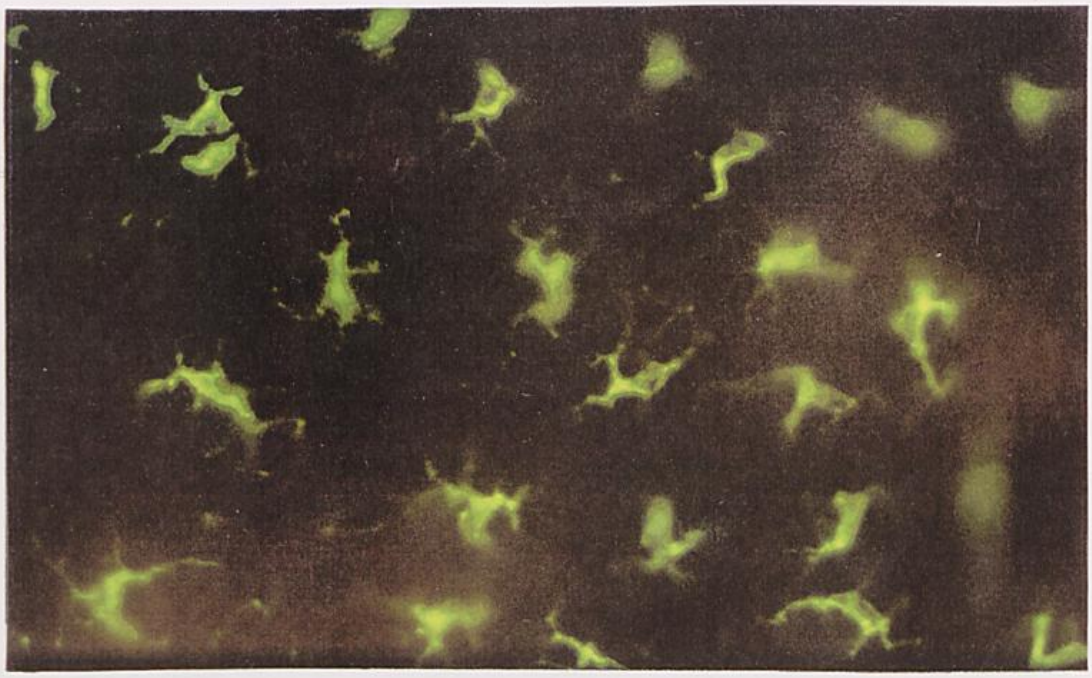

Foto 1b: Langerhanszellen eines epidermalen Sheets nach 48 Stunden Inkubation auf R10 in Organkultur: vergleichsweise zu Foto 1a erkennt man eine Abnahme der MHC-Klasse II positiven Langerhanszellen und Zunahme an Größe und Fluoreszenzintensität bei gleicher Belichtungszeit. Immunohistochemische Färbung gegen MHC-Klasse II (B21/2) bei einer 500 x Vergrößerung.

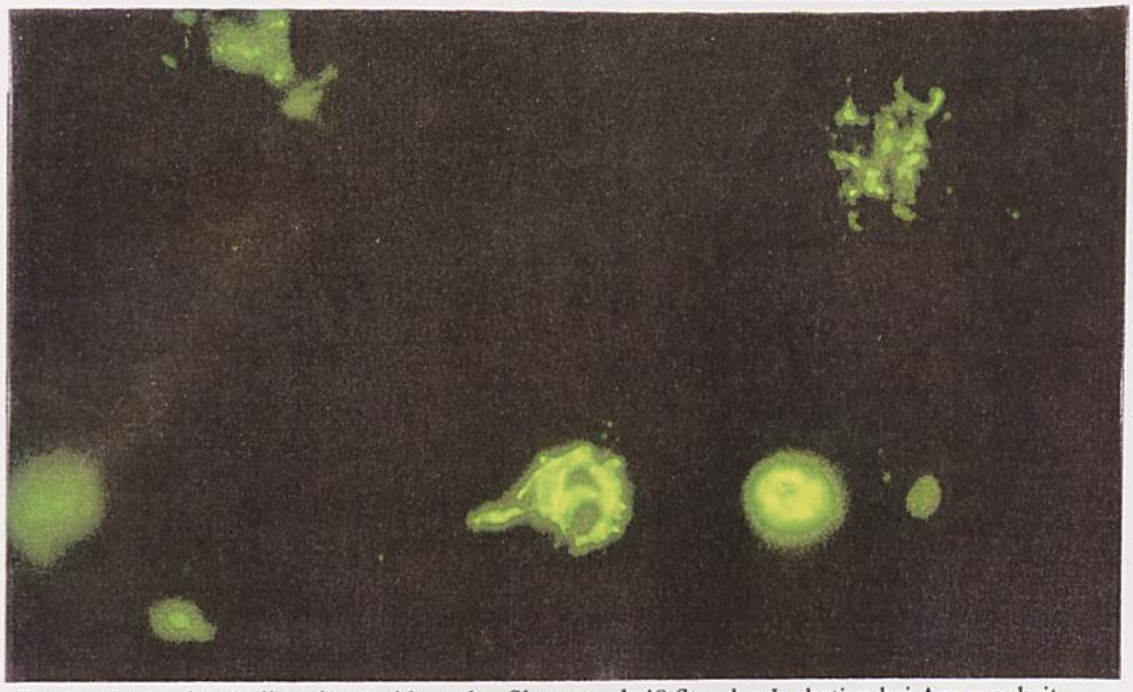

Foto 1c: Langerhanszellen eines epidermalen Sheets nach 48 Stunden Inubation bei Anwesenheit von 50 U/ml TNF-α in Organkultur: hier erkennt man die höchste Abnahme der MHC Klasse II positiven Langerhanszellen. Immunohistochemische Färbung gegen MHC-Klasse II (B21/2), bei einer 500 x Vergrößerung.

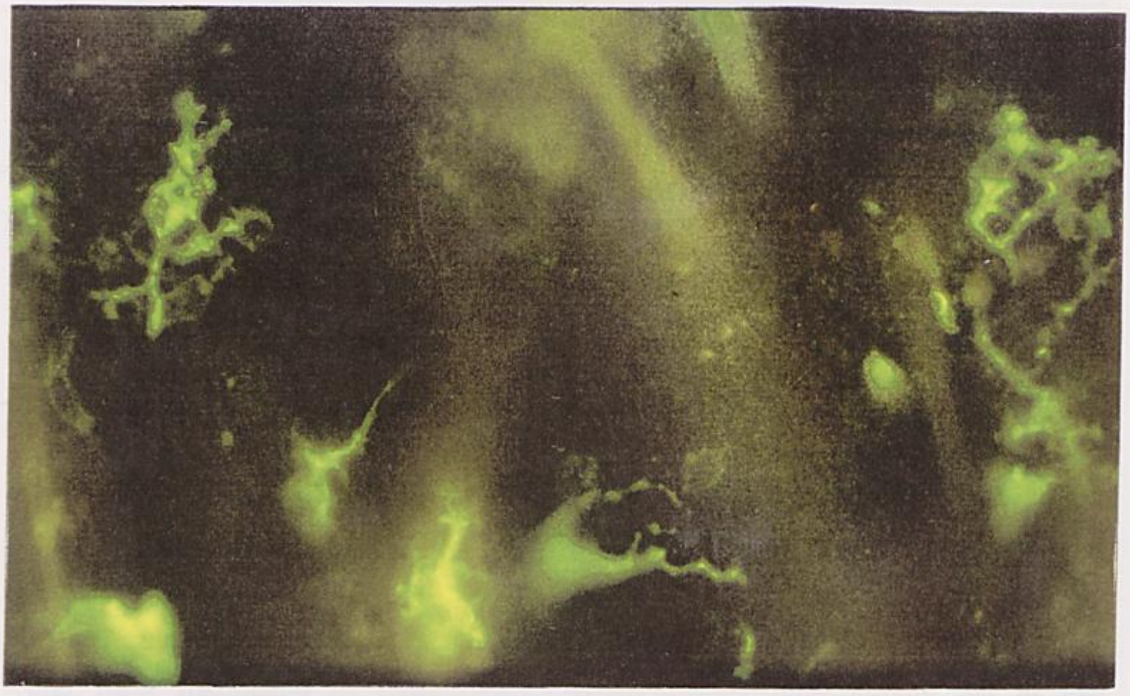

Foto 1d: Langerhanszellen eines epidermalen Sheets nach 48 Stunden Inubation bei Anwesenheit von 1000 U/ml TNF-α in Organkultur. hier vergleichsweise zu Foto 1c eine deutlich geringere Abnahme der Langerhanszellen Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

4.2.3 Die intraperitoneale Verabreichung von TNF–α verstärkt die Emigration der kutanen dendritischen Zellen aus der Epidermis .

In den folgenden Experimenten beobachtete ich die Wirkungen von intraperitoneal gespritztem TNF-α auf die Auswanderung in einer nachfolgenden Organkultur (Tabelle 4.2.3).Ich erwartete mir ebenso wie in der reinen Organkultur eine gesteigerte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen ins Medium.

Tabelle 4.2.3: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen nach intraperitonealer Verabreichung von TNF-α und anschließender Organkultut.

Experiment 9	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**%DC**
LO-DNP/R10	7700	3600	3400	100
TNF-α/TNF-α	4500	1000	3800	27
Experiment 12				
LO-DNP/R10	5750	3000	2750	100
TNF-α/TNF-α	1880	950	930	31
Experiment 13				
LO-DNP/R10	4950	4050	900	100
TNF-α/TNF-α	4650	2250	2400	55
Experiment 14				
LO-DNP/R10	8800	3600	5200	100
TNF-α/TNF-α	3000	1600	1400	44

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 16 h; Zytokinvolumen: 1 ml/Maus; TNF-α Konzentration: 100 U/ml. Inkubationszeiten:1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF. LO-DNP (Antikörper) wurde in R10 gelöst und als Kontrolle verwendet. Die Zählung erfolgte im Hämozytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Wider Erwarten konnte ich keine Steigerung in der Emigration kutaner dendritischer Zellen in das Medium beobachten, sondern eine Hemmung von durchschnittlich 60 %.

In einem zweiten Schritt färbte ich die epidermalen und dermalen Sheets vor und nach Inkubation in Organkultur. Überraschenderweise konnte ich in den epidermalen Sheets von TNF-α behandelten Mäusen nach Inkubation eine massive Auswanderung beobachten (siehe Fotos 2a-d) und in den dermalen Sheets der TNF-α behandelten Mäusen nach Inkubation die Ausbildung von Cords beobachten. Für das 16-stündige Intervall zwischen dem Spritzen des Zytokins und dem Abschneiden der Ohren bzw. Beginn der Organkultur (="Nachspritzzeit") ergab die Färbung der epidermalen Sheets keine Evidenz für eine Auswanderung der Langerhanszellen.

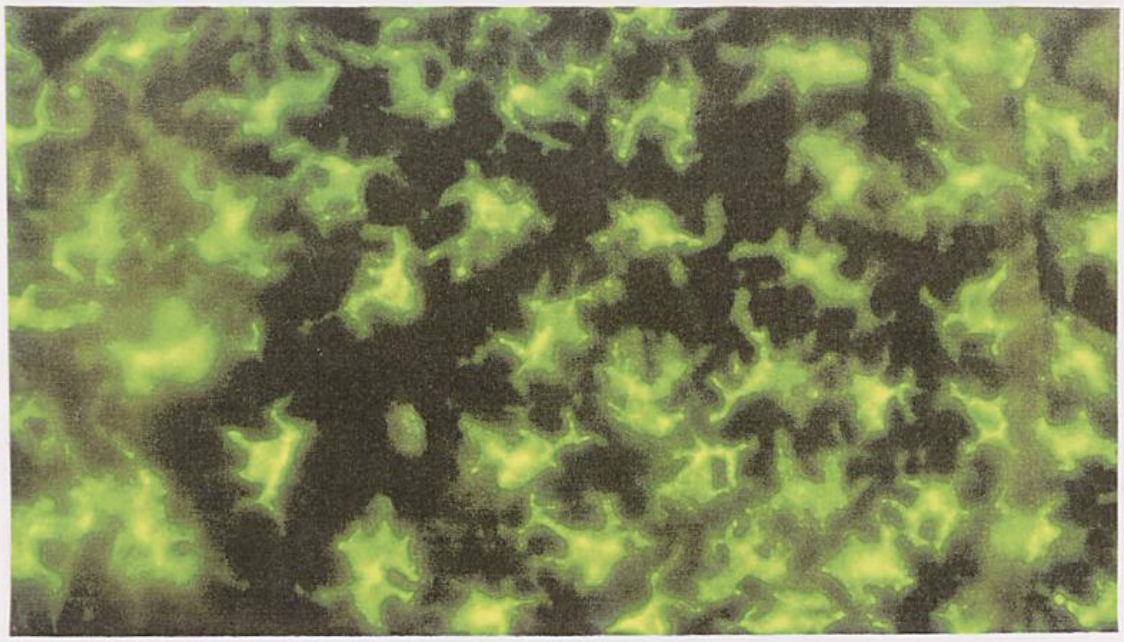

Foto 2a:Typische Verteilung der Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit LO-DNP (Kontrollantikörper) intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit: es ist keine Abnahme der Langerhanszellen ersichtlich. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

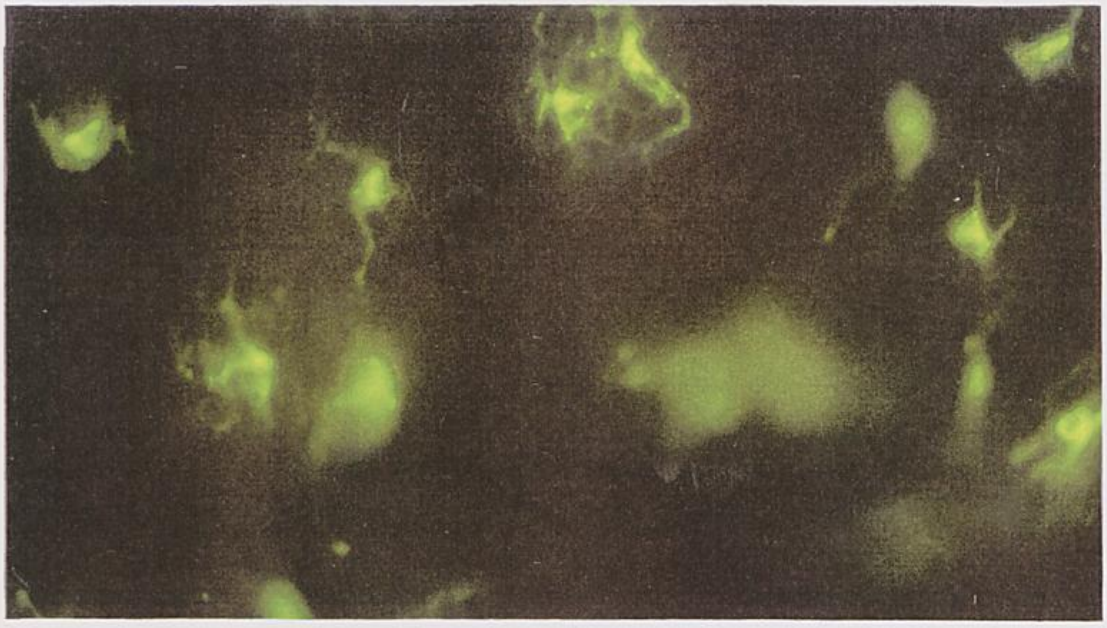

Foto 2b: Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit LO-DNP intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit und 48 Stunden Inkubation der Ohrhälften auf R10 in Organkultur: man sieht eine ähnlich Abnahme der Langerhanszellen wie nach 48 Stunden Kultur auf R10 ohne Vorbehandlung. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung

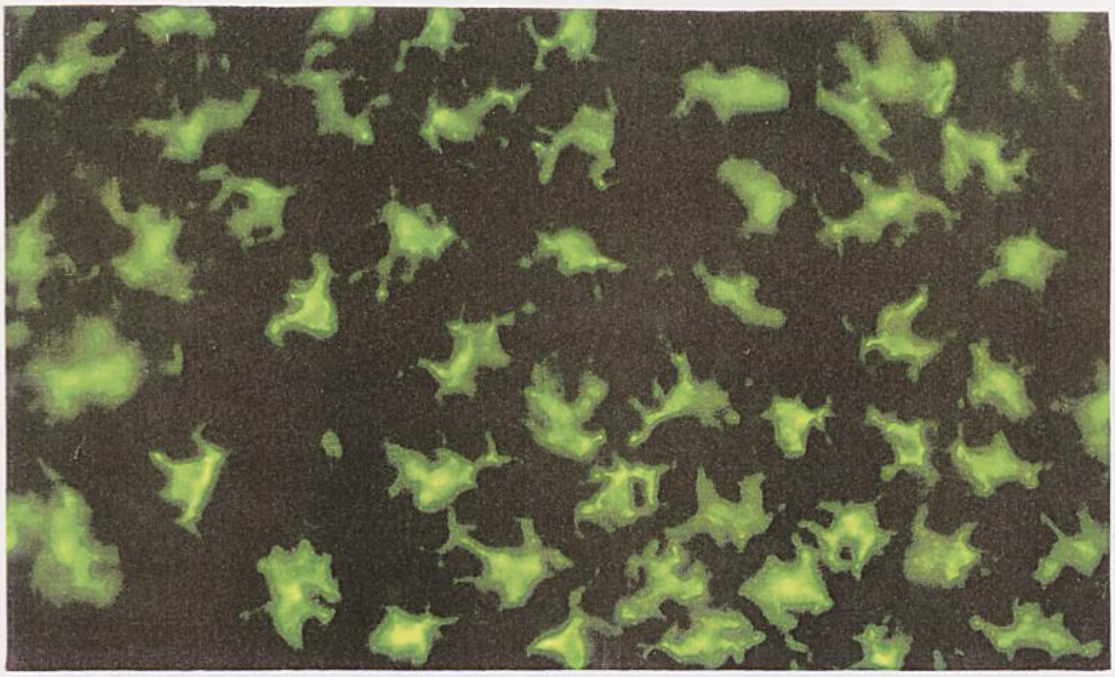

Foto 2c: Verteilung der Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit TNF-α 100 U/ml intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit: es ist wie in Foto 2a keine Abnahme der Langerhanszellen ersichtlich. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

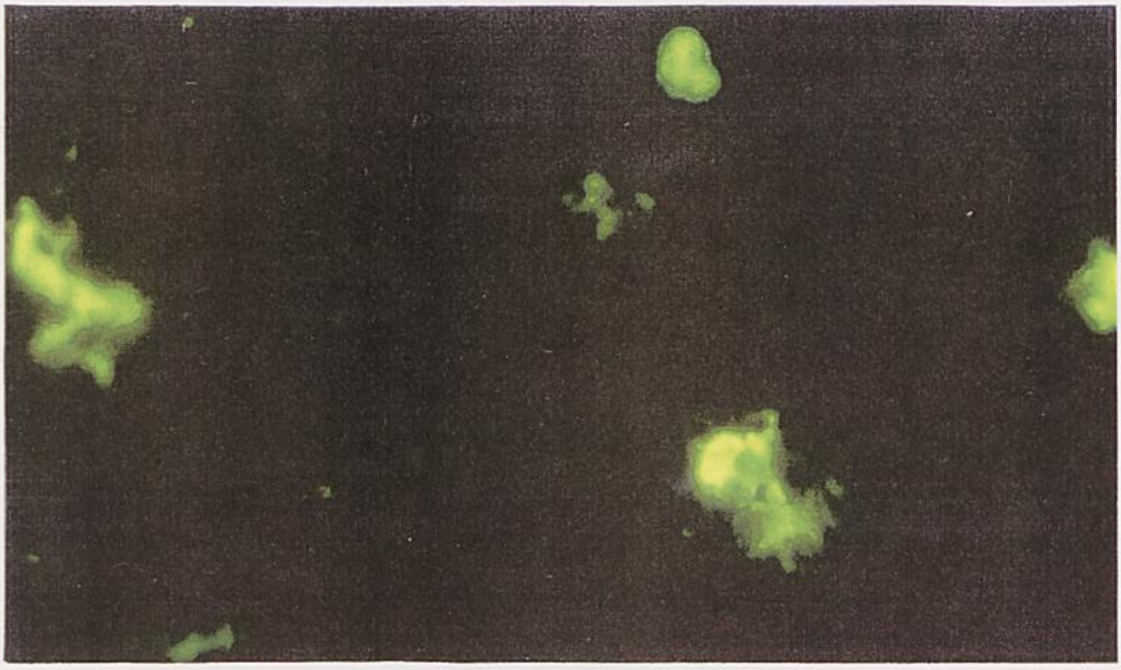

Foto 2d: Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit TNF-α 100 U/ml intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit und 48 Stunden Inkubation der Ohrhälften auf 100 U/ml TNF-α in Organkultur: man erkennt im Unterschied zu Foto 2b eine starke Abnahme der Langerhanszellen. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

4.3 Intraperitonal gespritztes anti-TNF–α inhibiert die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen aus Haut: ein in vivo/in vitro System.

Nachdem ich in meinem optimierten Organkultursystem eine gesteigerte Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe von 25 -50 U/ml TNF–α ins Medium beobachten konnte, müßte eine Hemmung der Migration kutaner dendritischer Zellen durch den entsprechenden Antikörper also durch anti-TNF–α möglich sein. Eine vergleichsweise gute Hemmung im Organkultursystem (siehe 4.2.2) war mir jedoch nicht immer möglich zu zeigen. Durch das Abschneiden der Mäuseohren könnte ein so massiver Effekt gesetzt werden, daß allein dadurch schon alle nötigen Stimuli für die Auswanderung in Gang gesetzt werden könnten. In diesem Falle könnte dann eine Zugabe von anti-TNF–α ins Medium nur wenig ausrichten, auch wenn die Ohren für 26 Stunden in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt werden.

Der von mir verwendete neutralisierende anti-Maus-TNF–α Antikörper, V1q (139), ist uns freundlicherweise von Dr. B. Echtenacher, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt worden. Ich habe den Antikörper aus den Hybridomzellen produziert und auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml aufkonzentriert (zur Methode siehe 3.2.7). In allen folgenden Experimenten wurde er in einer Konzentration von 0,3 mg/ml verwendet.

4.3.1 Vorexperimente zur Wirkung verschiedener Nachspritzzeiten nach anti-TNF–α Verabreichung auf die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen.

In den folgenden Experimenten testete ich verschiedene Nachspritzzeiten (Zeit zwischen dem intraperitonealen Spritzen und dem Abschneiden der Ohren) von 3 h, 6 h und 16 h und ihre Wirkung auf die Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen, und zwar im Vergleich zwischen intraperitoneal gespritztem LO-DNP (Ratte Antikörper-Supernatant, IgG2a) als Kontrolle und anti-TNF–α, wobei in beiden Versuchsansätzen die Ohren in der Organkultur auf R10 aufgelegt und inkubiert wurden. In der Tabelle 4.3.1/1 sind zunächst die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten bei einer Nachspritzzeit von 3 Stunden aufgelistet.

Tabelle 4.3.1/1: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von LO-DNP (Kontrolle) und anti-TNF–α bei 3 Stunden Nachspritzzeit und Inkubation auf R10.

Experiment 1	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	4680	3000	1680	100
anti-TNF–α/R10	4940	2500	2440	83
Experiment 2				
LO-DNP/R10	10120	6500	3630	100
anti-TNF–α/R10	6810	4620	2180	71

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 3h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF. anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Da die Hemmung der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen nach 3h Nachspritzzeit nur gering war (um 20 % - 30 %), erhöhte ich die Nachspritzzeit auf 6 h, wie in der Tabelle 4.3.1/2 gezeigt wird. Außerdem legte ich zusätzlich die Ohren, der mit anti-TNF–α gespritzten Mäuse, nicht nur auf R10 sondern parallel dazu auch auf anti-TNF–α, um einen möglicherweise verstärkten Effekt der Hemmung zu erzielen.

Tabelle 4.3.1/2: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von LO-DNP (Kontrolle) und anti-TNF–α bei 6 Stunden Nachspritzzeit und Inkubation auf R10 und anti-TNF–α.

Experiment 3	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	11660	7700	3960	100
anti-TNF–α/R10	8650	3750	4900	48
anti-TNF–α/anti-TNFα	5100	2400	2700	31
Expermint 4				
LO-DNP/R10	10160	5160	5000	100
anti-TNF–α/R10	6580	2830	3750	54
anti-TNF–α/anti-TNF–α	5580	3500	2080	67

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 3h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF. anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur

Nach 6 Stunden Nachspritzzeit erkennt man schon eine verstärkte Hemmung der Auswanderung kutaner dendritischer Zellen (bis zu 50 %) und ansatzweise einen noch massiveren Einfluß bei zusätzlicher Inkubation mit anti-TNF–α (bis zu 70 %).

Ich erhöhte die Nachspritzzeit auf 16 Stunden und legte sowohl Ohren mit LO-DNP (Kontrolle) als auch mit anti-TNF–α gespritzt auf R10-Kulturmedium und auf anti-TNF–α (siehe Tabelle 4.3.1/3).

Tabelle 4.3.1/3: Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von LO-DNP und anti-TNF–α bei 16 h Nachspritzzeit und Inkubation von beiden Varianten auf R10 und anti-TNF–α.

Experiment 5	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	22000	10000	12000	100
LO-DNP/anti-TNF–α	7000	5250	4750	52
anti-TNF–α/R10	9750	3500	6250	35
anti-TNF–α/anti-TNF–α	10500	2000	7500	20
Experiment 6				
LO-DNP/R10	19650	11020	8620	100
LO-DNP/anti-TNF–α	19650	10060	9850	91
anti-TNF–α/R10	16290	8150	8140	73
anti-TNF–α/anti-TNF–α	4800	3800	1000	34

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 16 h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Nach 16 Stunden Nachspritzzeit kann man die effektivste Hemmung (von 80 %) der Migration kutaner dendritischer Zellen durch anti-TNF–α beobachten, und zwar in jenem Versuchsansatz in dem sowohl anti-TNF–α intraperitoneal gespritzt als auch in das Kulturmedium zu 0,3 mg/ml zugegeben wurde (80 %). Doch auch in dem Versuch, wo die Ohren der mit anti-TNF–α intraperitoneal behandelten Mäuse auf R10-Kulturmedium kultiviert wurden, erhalte ich eine Hemmung von 65 %.

Parallel dazu wurden epidermale Sheets nach 16 h Nachspritzzeit (t0) und nach 48 h Inkubationzeit (t1) hergestellt, und mittels Immunofluoreszenz die in der Epidermis zurückbleibenden Langerhanszellen gefärbt (siehe Tabelle 4.3.1/3). Es ist anzunehmen, daß die Langerhanszell-Dichte nach der Nachspritzzeit unverändert bleibt und die Zahl der in der Epidermis bleibenden Langerhanszellen nach Organkultur sich umgekehrt proportional zur Zellzahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen verhält . Trifft dies zu, kann man auf eine effektive Hemmung von anti-TNF–α schließen.

Tabelle 4.3.1/3: Immunfluoreszenzfärbung epidermaler Sheets nach 16 h Nachspritzzeit (t0) bzw. nach 48 h (t1) Inkubationszeit.

	B21/2 (IgG2b, rat)	**Rb6 (IgG2b, rat)**
LO-DNP t0	+++	-
anti-TNF–α t0	+++	-
LO-DNP/R10 t1	+	-
anti-TNF–α/R10 t1	++	-
anti-TNF–α/anti-TNF–α t1	++	-

Legende: B21/2: IgG2b Ratte Ak, färbt spezifisch Langerhans-Zellen an; Rb6: IgG2b, Isotypkontrolle; Auswertmethode: semi-quantitative Methode : +++ netzartige Verteilung der Langerhans-Zellen; ++ einige Langerhans-Zellen; + wenige Langerhans-Zellen; - keine Langerhans-Zellen.

Die Zahl der in der Epidermis zurückbleibenden Langerhanszellen korreliert also mit der Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen in das Kulturmedium während 48 h Inkubation. In den Fotos 3a-c werden die epidermalen Sheets der verschiedenen Ansätze gegenübergestellt.

Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse:

In Abb 4.3.1 ist die steigende Hemmung der Langerhanszell-Migration in Abhängikeit der verlängerten Nachspritzzeiten von 3 h, 6 h und 16 h dargestellt.

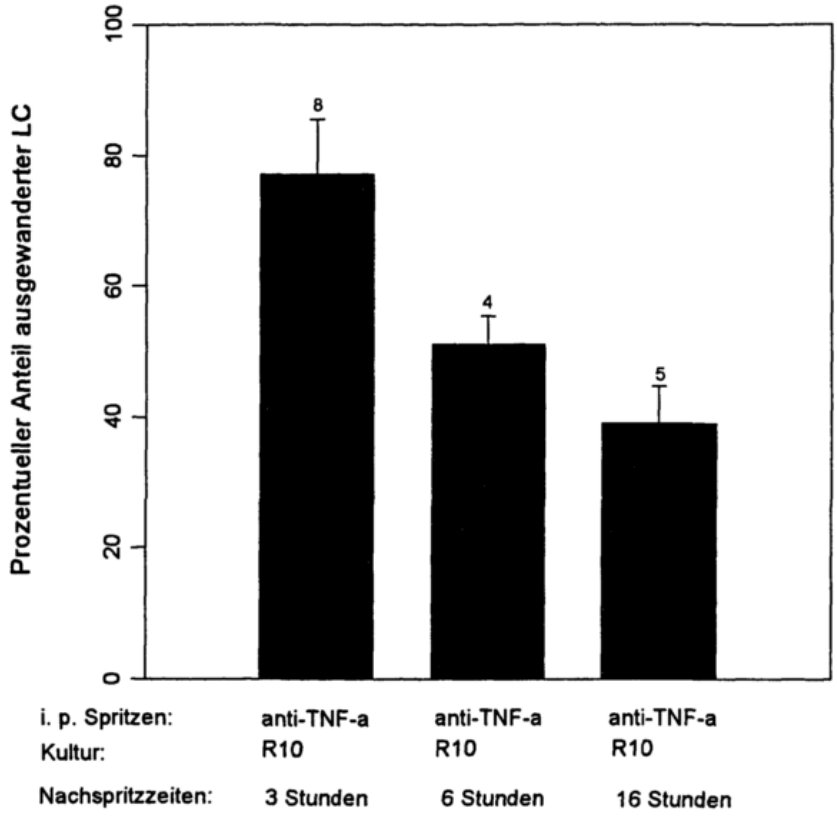

Abb 4.3.1: Die gesteigerte Hemmung der Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen in das Kulturmedium nach intraperitonealer Verabreichung von anti-TNF–α und Inkubation auf R10 in Abhängikeit von 3 h, 6 h und 16 h Nahcspritzzeit. Die Auswanderung bei Spritzen von LO-DNP Kontrollantikörper und nachfolgender Kultur in R10 wird als 100 % gesetzt.

Deshalb wurden dann alle weiteren Experimente unter den folgenden Versuchsbedingungen durchgeführt:

Nachspritzzeit:	16 Stunden
i.p.Spritzen und Kultur:	anti-TNF-α

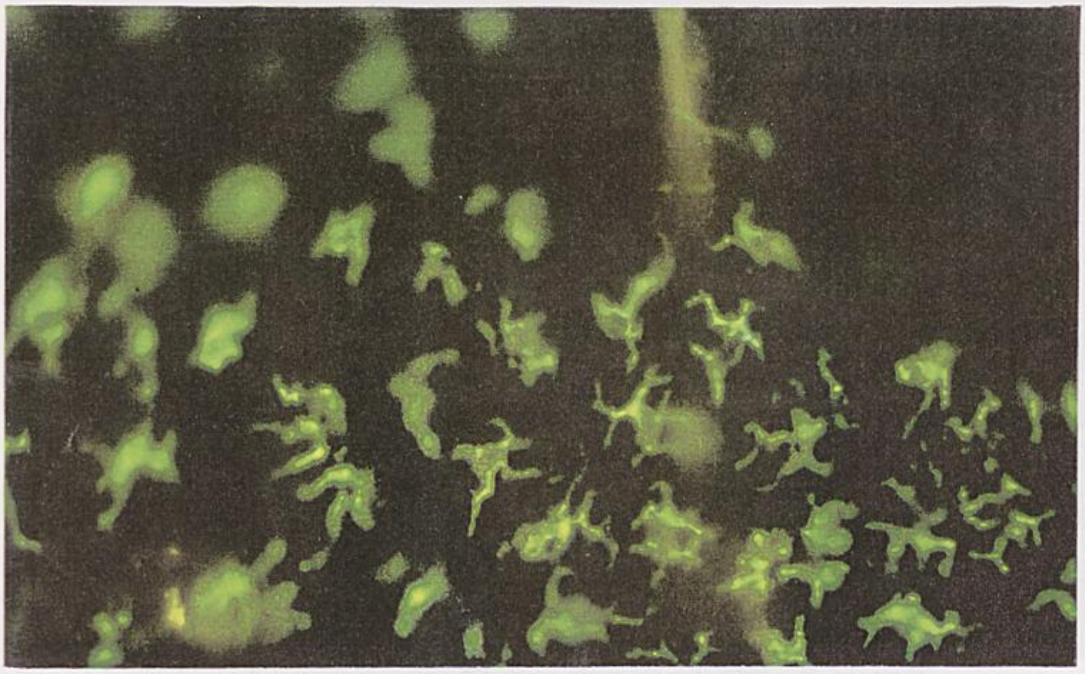

Foto 3a: Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit anti-TNF-α (0,3 mg/ml) intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit : man erkennt die typische netzartige Verteilung der Langerhanszellen ähnlich wie in einem unbehandelten Sheet. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

Foto 3b: Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit LO-DNP (Kontrollantikörper) intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit und 48 Stunden Inkubation der Ohrhälften auf R10 in Organkultur: es findet vergleichend zu Foto 3a eine Abnahme der Langerhanszellen statt. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

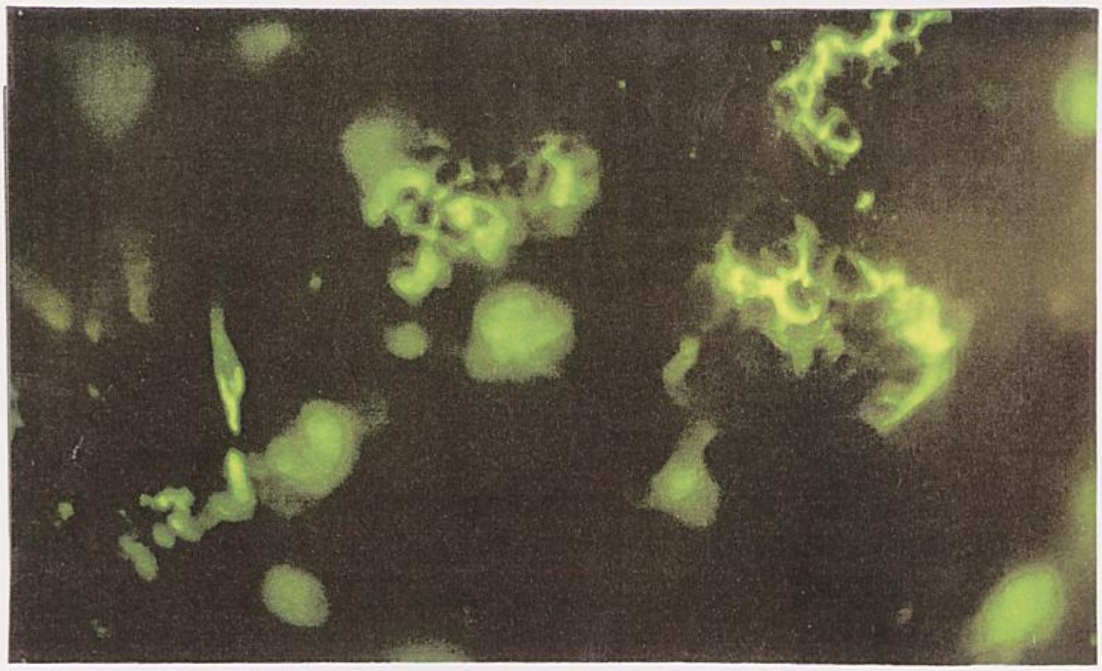

Foto 3c: Langerhanszellen im epidermalen Sheet von einer mit anti-TNF-α (0,3 mg/ml) intraperitoneal behandelten Maus nach 16 Stunden Nachspritzzeit und 48 Stunden Inkubation der Ohrhälften auf anti-TNF-α (0,3 mg/ml) in Organkultur: hier erkennt man eine deutlich geringere Abnahme der Langerhanszellen vergleichend zu jener von Foto 2b. Immunohistochemische Färbung gegen MHC Klasse II (B21/2),bei 500 x Vergrößerung.

4.3.2 Inhibierung der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen aus der Haut durch Verabreichung von anti-TNF–α und Kultur nach 16 Stunden Nachspritzzeit (Einzelexperimente).

Wie aus den Experimenten des vorangegangenen Kapitels ersichtlich ist, haben verschiedene Nachspritzzeiten auf die Migration der kutanen dendritischen Zellen einen Einfluß. Jene Nachspritzzeit, welche mir erlaubt die Unterschiede zwischen Hemmung und nicht Hemmung am besten zu beobachten, beträgt 16 Stunden. Deswegen führte ich eine Reihe von Versuchen durch, bei denen die Parameter immer dieselben blieben, um dann einen Vergleich ziehen zu können, wie groß der Hemmeffekt von anti-TNF–α ist.

In der folgenden Tabelle 4.3.2/1 sind jene Ergebnisse der Experimente aufgelistet, in welchen sei es LO-DNP (Kontrolle) als auch anti-TNF–α i.p gespritzt wurde und die mit LO-DNP behandelten Ohren auf R10 und anti-TNF–α , die anti-TNF–α behandelten Ohren nur auf anti-TNF–α inkubiert wurden. Zu Vergleichszwecken sind hier zwei Experimente aus dem vorangegangenen Kapitel mit aufgelistet (Experiment 5 und 6).

Tabelle 4.3.2/1: Hemmung der Auswanderung kutaner dendritischer Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von anti-TNF–α nach 16 Stunden Nachspritzzeit .

Experiment 5	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10 (Kontrolle)	22000	10000	12000	100
LO-DNP/anti-TNF–α	7000	5250	4750	52
anti-TNF–α/anti-TNF–α	10500	2000	7500	20
Experiment 6				
LO-DNP/R10 (Kontrolle)	19650	11020	8625	100
LO-DNP/anti-TNF–α	19650	10060	9580	91
anti-TNF–α/anti-TNF–α	4800	3800	1000	34
Experiment 7				
LO-DNP/R10 (Kontrolle)	20000	10750	9080	100
LO-DNP/anti-TNF–α	15800	8000	7800	74
anti-TNF–α/anti-TNF–α	11920	4410	7500	41
Experiment 8				
LO-DNP/R10 (Kontrolle)	16880	6670	10200	100
LO-DNP/anti-TNF–α	13130	4380	8750	65
anti-TNF–α/anti-TNF–α	8350	2700	5480	40

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 16 Stunden; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Anhand der Ergebnisse aus Tabelle 4.3.2/1 erkennt man eine sukzessive Steigerung der Migrationshemmung kutaner dendritischer Zellen, die in Abb.4.3.2 graphisch dargestellt ist:

* intraperitoneale Verabreichung von anti-TNF-α und Inkubation der Ohrhälften auf R10 Kulturmedium bewirkt ein Hemmung der Migration um ca. 30-40 %

* intraperitoneale Verabreichung von anti-TNF–α und Zugabe desselben in das Kulturmedium ruft eine noch gesteigerte Hemmung von 60-80 % hervor.

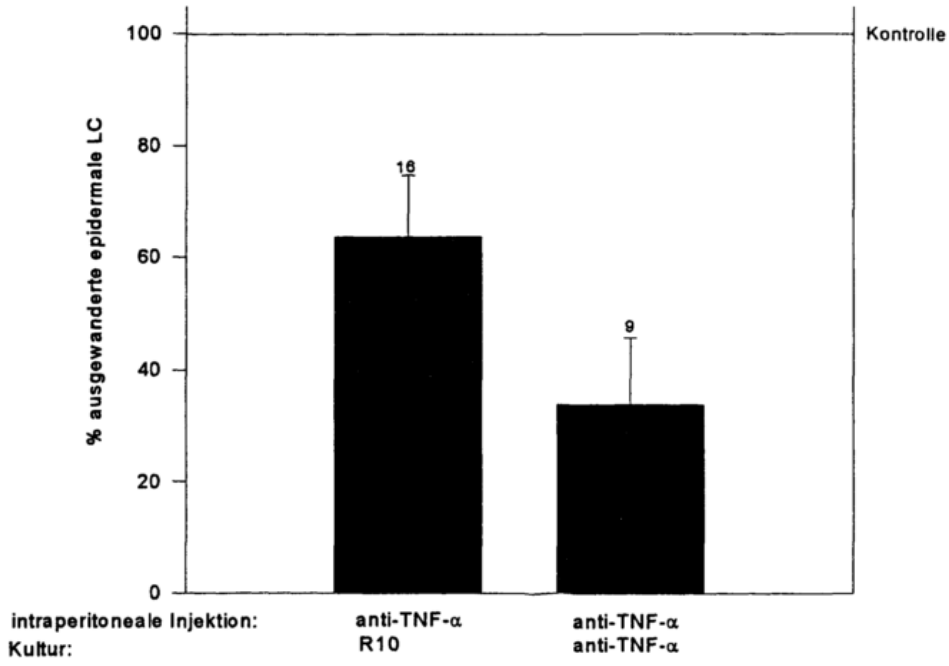

Abb. 4.3.2: Die Inhibition der Migration kutaner dendritischer Zellen aus der Epidermis ist ein Prozeß, der sei es von der i. p. Verabreichung als auch von der Zugabe von anti-TNF–α im Kulturmedium abhängt. Die Auswanderung bei Spritzen von LO-DNP Kontrollantikörper und nachfolgender Kultur in R10 wird als 100 % gesetzt.(n=7).

4.3.3 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.

Tabelle 4.3.3/1 zeigt die Werte von 7 verschiedenen Experimenten, die immer nach der gleichen Methodik durchgeführt wurden. In allen Fällen hemmte der Antikörper die Auswanderung beträchtlich (70% +/-9): wenige kutane dendritische Zellen wandern ins Medium aus, wenn das Zytokin TNF-α neutralisiert wurde.

Tabelle 4.3.3/1: Migration kutaner dendritischer Zellen nach intraperitonealer Verabreichung einerseits von LO-DNP und Kultur auf R10 (Kontrolle) und andererseits von anti-TNF–α und Kultur auf anti-TNF–α.

	LO-DNP/R10 (DC %)	anti-TNF–α/anti-TNF–α (DC %)
Exp. 5	100	20
Exp. 6	100	34
Exp. 7	100	41
Exp. 8	100	40
Exp. 9	100	27
Exp. 10	100	22
Exp. 11	100	44
Mittelwert:	100	32 (+/-9)

Legende: Mausstamm: BALB/c; Nachspritzzeit: 16 Stunden; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml. Setzt man die Langerhans-Zellen-Zahl bei LO-DNP/R10 als die 100 % der möglichen ausgewanderten Langerhans-Zellen , so kann man den prozentuellen Anteil der ausgewanderten Langerhans-Zellen bei anti-TNF–α/anti-TNF–α berechenen. Abgabe von Mittelwer^t und Standardabweichung in Klammer.

Ich erzielte also bei intraperitonealer Verabreichung und bei Anwesenheit von anti-TNF–α im Kulturmedium eine Hemmung der Migration der kutanenen dendritischen Zellen von 70 % (Standardabweichung: +/- 9).

4.4 Eine Zytokinkaskade aus TNF-α und IL-1ß könnte die Migration kutaner dendritischer Zellen steuern.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte ich zeigen, daß einerseits die Zugabe von TNF–α 25 U/ml- 50 U/ml in Organkultur eine gesteigerte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen hervorruft und andererseits die intraperitoneale Verabreichung von anti-TNF–α in der folgenden Organkultur eine Hemmung der Auswanderung kutaner dendritischer Zellen verursacht. Somit konnte ich zeigen, daß TNF–α in diesem System eine Schlüsselrolle in der kutanen dendritischen Zellen-Migration spielt.

4.4.1 Wirkung verschiedener IL-1ß-Konzentrationen in Organkultur auf die Emigration kutaner dendritischer Zellen.

In den folgenden Versuchen testete ich die Wirkung von verschiedenen IL-1ß Konzentrationen (2 U/ml und 4 U/ml) und von anti-IL-1ß (10 µg/ml) auf die Migration kutaner dendritischer Zellen aus (siehe Tablle 4.4.1/1).

Das hier von mir verwendete IL-1ß ist eine rekombinantes Maus IL-1ß (von Genzyme, Code: 1921-01) mit einer spezifischen Aktivität von 3,5 * 10^5 Units/mg. Das anti-IL-1ß ist ein anti-muriner IL-1ß neutralisierender Antikörper (von Biomedica, Code: AB 401 NA) der Ziege.

Tabelle 4.4.1/1: Emigration kutaner dendritischer Zellen bei Zugabe von 2 U/ml und 4 U/ml IL-1ß und 10 µg/ml anti-IL-1ß in Organkultur.

Experiment 1	Gesamt	DC	Andere	DC %
R10 (Kontrolle)	8750	7080	1040	100
IL-1ß (2 U/ml)	13340	10830	1660	152
Experiment 2				
R10 (Kontrolle)	11460	7700	1260	100
IL-1ß (4U/ml)	6670	4580	1490	59
Experiment 3				
R10 (Kontrolle)	11460	7710	1250	100
IL-1ß (2U/ml)	4000	3750	50	48
anti-IL-1ß (10 µg/ml)	4500	4000	500	51
Experiment 4				
R10 (Kontrolle)	4840	2160	2660	100
anti-IL-1ß (10 µg/ml)	5500	1830	3670	85

Legende: Mausstamm: BALB/C, Abliegezeit: 24h, Inkubationszeit: 48h, Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Vergleicht man die Ergebnisse gleicher Versuchsansätze so variieren sie stark untereinander: in Experiment 1 konnte durch 2 U/ml IL-1ß eine erhöhte Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen (152 %) beobachtet werden, in Experiment 2 (4 U/ml Il1ß) und Experiment 3 (2 U/ml IL-1ß) hingegen konnte eine verringerte Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen (50 %) festgestellt werden. Die Wirkung von anti-IL-1ß auf die Emigration kutaner dendritischer Zellen war in beiden Versuchen eher hemmend (51 % und 85 %).

Da die Ergebnisse unter gleichen Bedingungen sehr unterschiedlich waren, nahm ich an, daß entweder mein gewähltes Organkulturmodell für diese Untersuchungen nicht geeignet war, oder daß die gewählten Dosen von Il-1ß nicht im biologisch wirksamen Bereich lagen. Deshalb untersuchte ich zuerst, ob die intraperitoneale Verabreichung von IL-1ß ein besseres Modell für Beobachtung der

Migration kutaner dendritischer Zellen sei. In einem weiteren Schritt (siehe Punkt 4.4.4) testete ich höhere Konzentrationen von IL-1ß.

4.4.2 Wirkung der intraperitonealen Verabreichung von IL-1ß auf die Auswanderungsrate kutaner dendritischer Zellen.

Da die intraperitoneale Verabreichung von anti-TNF–α auf die Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen ein geeignetes System darstellt, die Hemmung der Migration der kutanen dendritischen Zellen zu beobachten, lag es nahe dieses System für die Untersuchung der Wirkungen von IL-1ß zu verwenden. Deshalb behielt ich zunächst die Parameter der intraperitonealen Verabreichung von anti-TNF–α bei: 1ml Zytokin oder 1 ml Antikörper/Maus, 16 Stunden Nachspritzzeit und 48 Stunden Inkubationszeit (siehe Tabelle 4.4.2/1).

Tabelle 4.4.2/1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei intraperitonealer Verabreichung und/oder Kultur von IL-1ß oder anti-IL-1ß.

Experiment 5	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	10170	5160	5540	100
IL-1ß/R10	6080	3330	2750	64
Experiment 6				
LO-DNP/R10	7000	3600	3400	100
anti-IL-1ß	10200	3600	6000	100
Experimetn 7				
LO-DNP/R10	4060	2390	1670	100
IL-1ß/IL-1ß	3230	1460	1770	60
Experiment 8				
LO-DNP/R10	4950	4050	900	100
IL-1ß/IL-1ß	2850	1050	1800	26
anti-IL-1ß/anti-IL-1ß	3000	1500	1500	37
Experiment 9				
LO-DNP/R10		4600		100
anti-IL-1ß/anti-IL-1ß		3100		67

Legende: Mausstamm: BALB/c oder C57bl; Zytokin/Anti-Zytokin Volumen: 1ml/Maus, Nachspritzzeit: 16 h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; IL-1ß-Konzentration: 11 U/ml; anti-IL-1ß-Konzentration: 10 µg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Bei der intraperitonealen Verabreichung von IL-1ß konnte ich nicht, wie vermutet, eine erhöhte Auswanderungsrate beobachten, sondern eine Verminderung. Bei der Verabreichung von anti-IL-1ß konnte ich hingegen eine Hemmung der Migration der kutanen dendritischen Zellen beobachten.

Da IL-1ß auch als inflammatorisches Zytokin wirksam sein kann und es nicht bekannt ist, welche Reaktionen es während der 16 Stunden Nachspritzzeit im Körper auslöst (stimuliert vielleicht die Expression anderer Zytokine, die in antagonistischer Weise zum IL-1ß wirken könnten), versuchte ich die Nachspritzzeiten zu ändern. Zunächst verkürzte ich sie auf 6 Stunden (siehe Tabelle 4.4.2/2) und dann auf 3 Stunden (siehe Tabelle 4.4.2/3).

Tabelle 4.4.2/2: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von IL-1ß und nach 6 Stunden Nachspritzzeit.

Experiment 10	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	11670	7710	4070	100
IL-1ß/R10	9380	4380	5000	56
Experiment 11				
LO-DNP/R10	7500	3540	3960	100
IL-1ß/R10	8540	4380	4160	123

Legende: Mausstamm: BALB/c; Zytokin Volumen: 1ml/Maus, Nachspritzzeit: 6 h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; IL-1ß-Konzentration: 11 U/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Tabelle 4.4.2/3: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei intraperitonealer Verabreichung von IL-1ß und nach 3 Stunden Nachspritzzeit.

Experiment 12	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP/R10	10250	6500	3630	100
IL-1ß/R10	12810	7500	5310	115
Experiment 13				
LO-DNP/R10	4690	3000	1690	100
IL-1ß/R10	1880	1380	500	45
Experiment 14				
LO-DNP/R10	5750	3000	2750	100
IL-1ß/R10	5500	4000	1500	133

Legende: Mausstamm: BALB/c; Zytokin-Volumen: 1ml/Maus, Nachspritzzeit: 3 h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; IL-1ß-Konzentration: 11 U/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Wie anhand der Ergebnisse aus den Tabellen 4.4.2/2 und 4.4.2/3 gesehen wird, kann durch Änderung der Nachspritzzeiten nach intraperitoneal Verabreichung von IL-1ß keine reproduzierbare Erhöhung der Migration der kutanen dendritischen

Zellen erzielt werden. Bei den Experimenten 11, 12 und 14 kann ich eine erhöhte Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen der Ohren von Il-1ß gespritzten Mäusen relativ zu den LO-DNP (Kontrolle) behandelten beobachten, doch gleichzeitig bei immer gleicher Versuchsanordnung kann ich bei Experiment 10 und 13 eine Verminderung um ca. 50 % der Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen verzeichnen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch durch Verkürzung der Nachspritzzeiten keine Erhöhung der Emigration der kutanen dendritischen Zellen erzielt werden kann. Den TNF–α Experimenten folgenden hatte ich beobachtet, daß bei niederen Dosen von TNF–α die Migration der kutanene dendritischen Zellen gesteigert werden kann und hohe Dosen hemmend auf die Emigration wirken. So stellte ich die Hypothese auf, daß es sich beim IL-1ß gleich verhalten könnte. Deshalb änderte ich die IL-1ß-Konzentrationen: 11 U/ml, 3,7 U/ml und 1,1 U/ml (siehe Tabelle 4.4.2/4).

Tabelle 4.4.2/4: Emigration der kutanen dendritischen Zellen bei verschiedenen IL-1ß Konzentrationen

Experiment 11	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
LO-DNP / R10	7500	3540	3960	100
IL-1ß 11 U/ml / R10	8540	4370	4160	123
IL-1ß 3,7 U/ml / R10	6350	3120	3220	88
IL-1ß 1,1 U/ml / R10	6980	4060	2920	114

Legende: Mausstamm BALB/c; Zytokin-Volumen: 1ml/Maus, Nachspritzzeit: 6 h; Inkubationszeiten: 1) 24h mit Ohren, 2) 24h ohne Ohren mit Zugabe von 250 U/ml GM-CSF; IL-1ß-Konzentration: 11 U/ml, 3,7 U/ml und 1,1 U/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte. Angaben vor dem Schrägstrich: Injektion i.p./Angaben nach dem Schrägstrich: Zugabe zur Organkultur.

Doch auch bei der Herabsetzung der IL-1ß Dosen konnte keine deutliche Erhöhung in der Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen erzielt werden.

4.4.3 Kombinationen von IL-1ß (50 U/ml), TNF–α (50 U/ml) und ihren Antikörpern in Organkultur weisen auf eine Zytokinkaskade hin.

Letztendlich versuchte ich durch wesentliche Erhöhung der IL-1ß Konzentration eine Stimulation der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen zu erzielen. Ich verwendete dafür nun ein rekombinantes murines IL-1ß aber mit einer wesentlichen höheren spezifischen Aktivität 1×10^7 Units/mg als das vorhergehende ($3{,}5 \times 10^5$ Units/mg). Auch arbeitete ich wieder im Organkultursystem, da mir schien, daß das intraperitoneal Spritzen von Zytokinen einige Prozesse in der Maus

hervorruft, die es nicht mehr ermöglichen eine Änderung der Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen aus der Ohrepidermis zu beobachten.

Zunächst erhöhte ich die IL-1ß Konzentration auf 30 U/ml (siehe Tabelle 4.4.3/1) und ließ alle restlichen Parameter der Organkultur unverändert.

Tabelle 4.4.3/1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe von 30 U/ml IL-1ß, 50 U/ml TNF–α und Kombinationen mit ihren Antikörpern in Organkultur.

Experiment 15	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
R10	5900	3790	2190	100
TNF–α	11700	8130	3570	214
anti-TNF–α	3400	1660	1740	43
TNF–α + anti-TNF–α	4480	2650	1830	70
IL-1ß	15480	6720	8470	177
anti-IL-1ß	5500	1830	3670	47
TNF–α + anti-IL-1ß	4730	3400	1330	89

Legende:Mausstamm: BALB/c; Abliegezeit: 26 h; Inkubationszeit: 48 h; TNF-Konzentration: 50 U/ml; IL-1ß Konzentration: 30 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml; anti-IL1ß Konzentration: 10 µg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Aus der Tabelle 4.4.3/1 ist ersichtlich, daß durch Zugabe von 30 U/ml IL-1ß eine stark erhöhte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen (177 %) stattfand, andererseits durch Zugabe von anti-IL-1ß eine gute Hemmung (47 %) beobachtet werden konnte. Als Kontrollen wurden auch die schon bekannte Wirkung von TNF–α und anti-TNF–α beobachtet, die in diesen Experimenten den Erwartungen entsprachen.

In den folgenden Experimenten (siehe Tabelle 4.4.3/2) wurde die IL-1ß-Konzentration auf 50 U/ml erhöht und verschiedene Kombinationen von Zytokinen und ihren Antikörpern auf die Migration der kutanen dendritischen Zellen getestet, um eine mögliche zeitliche und kausale Wirkfolge feststellen zu können.

Tabelle 4.4.3/2: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe von verschiedenen Zytokinen und ihren Antikörper im Organkultursystem.

Experiment 16	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
R10 (Kontrolle)	3780	2630	1150	100
TNF–α	6880	5380	1500	200
anti-TNF–α	3630	2380	1250	90
TNF–α + anti-TNF–α	4130	3000	1130	114
IL-1ß	5000	3750	1250	142
IL-1ß +anti-IL-1ß	/	/	/	/
IL-1ß + anti-TNF–α	/	/	/	/
TNF–α + anti-IL-1ß	/	/	/	/
Experiment 17				
R10 (Kontrolle)	17800	5500	12300	100
TNF–α	19170	8500	10670	154
anti-TNF–α	/	/	/	/
TNF–α + anti-TNF–α	15830	4600	11230	84
IL-1ß	20000	7500	12500	136
IL-1ß +anti-IL-1ß	/	/	/	/
IL-1ß + anti-TNF–α	20500	9000	11500	163
TNF–α + anti-IL-1ß	/	/	/	/
Experiment 18				
R10 (Kontrolle)	8930	5250	3680	100
TNF–α	14700	12070	2630	229
anti-TNF–α	17250	7480	9770	
TNF–α + anti-TNF–α	7880	3680	4200	70
IL-1ß	11500	8620	2880	164
IL-1ß +anti-IL-1ß	6330	4600	1720	87
IL-1ß + anti-TNF–α	7700	4600	3100	87
TNF–α + anti-IL-1ß	7580	4700	2880	89
Experiment 19				
R10 (Kontrolle)	17330	11550	5780	100
TNF–α	28880	17850	11030	154
anti-TNF–α	8800	5500	3300	47
TNF–α + anti-TNF–α	11880	8130	3750	70
IL-1ß	16250	14380	1870	125
IL-1ß +anti-IL-1ß	13130	10630	2500	92
IL-1ß + anti-TNF–α	17250	12650	4600	109
TNF–α + anti-IL-1ß	17970	10940	7030	94
Experiment 20				
R10 (Kontrolle)	6240	4560	1680	100
TNF–α	11400	7800	3600	171
anti-TNF–α	3480	1680	1800	37
TNF–α + anti-TNF–α	8040	4560	3480	100
IL-1ß	8400	5760	2640	126
IL-1ß +anti-IL-1ß				
IL-1ß + anti-TNF–α	7800	4350	3450	96
TNF–α + anti-IL-1ß	5200	2800	2400	62

Legende:Mausstamm: BALB/c; Abliegezeit: 26 h; Inkubationszeit: 48 h; TNF-Konzentration: 50 U/ml; IL-1ß Konzentration: 50 U/ml; anti-TNF–α Konzentration: 0,3 mg/ml; anti-Il1ß Konzentration: 10 µg/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Wie aus Abb.4.4.3 ersichtlich ist, konnte durch Zugabe von TNF-α eine Steigerung der Migration kutaner dendritischer Zellen ins Kulturmedium beobachtet werden. Dieser Effekt war spezifisch, da er mit anti-TNF-α Antikörper neutralisiert werden konnte (Säule 2). Er wurde aber auch durch anti-IL-1ß Antikörper neutralisiert (Säule 3). Das läßt darauf schließen, daß TNF-α nicht direkt, sondern via IL-1ß wirkt.

IL-1ß steigert in gleicher Weise, wie TNF-α die Auswanderung (Säule 4). Auch dieser Effekt war spezifisch. Er konnte mit anti-IL-1ß neutralisiert werden (Säule 5). Anti-TNF-α jedoch hemmte den Effekt von exogen zugegebenen IL-1ß nur unvollständig (Säule 6). Daraus kann gefolgert werden, daß bei Vorhandensein von ausreichend IL-1ß kein TNF-α mehr benötigt wird. Das könnte bedeuten, daß TNF-α die Produktion oder Freisetzung von Il-1ß induziert. Da ich die migrationsfördernde Wirkung von Il-1ß nur über einen relativ beschränkten Konzentrationsbereich getestet hatte (2-50 U/ml)-im Gegensatz zu TNF-α (25-10000 U/ml)- versuchte ich, die optimale Konzentration für dieses Zytokin zu ermitteln.

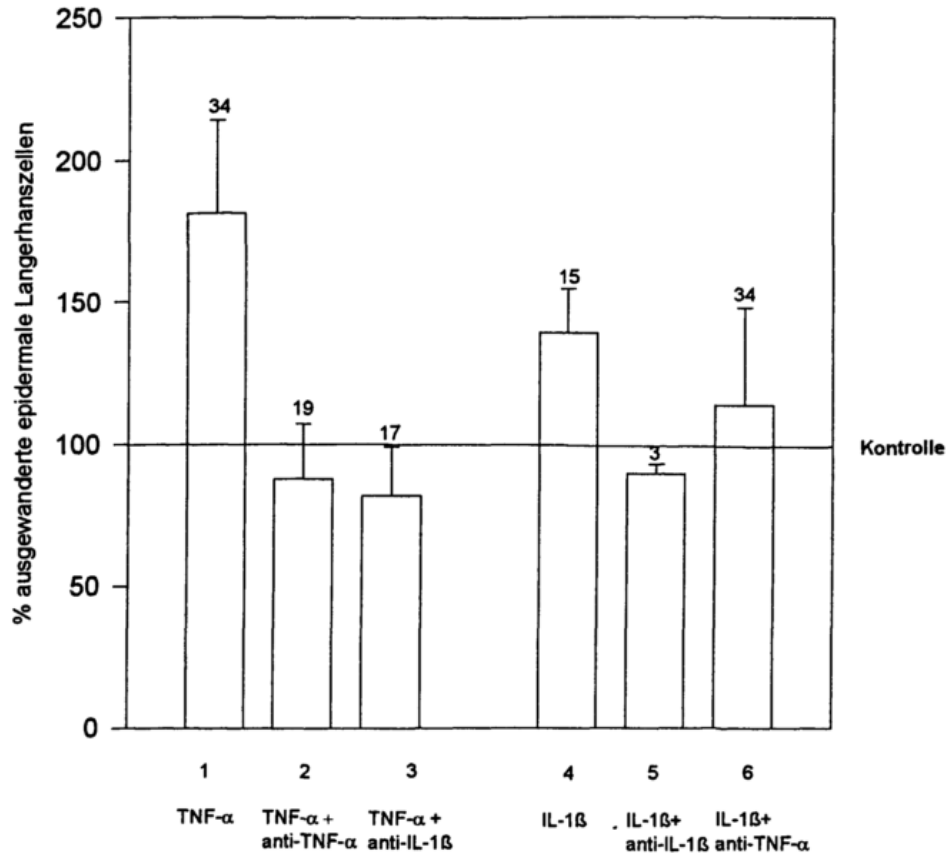

Abb. 4.4.3: Graphische Darstellung der Daten aus der Tabelle 4.4.3/2. Die Auswanderung ins Kulturmedium ohne Zusätze wurde als 100 % angenommen. (N=6)

4.4.4 Erhöhung der IL-1ß Konzentration (500 U/ml) führt zu einer gesteigerten Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen.

Da ich mit einer Konzentration von 50 U/ml die Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen im Organkultursystem erhöhen konnte, beobachtete ich den Einfluß auf die Emigration bei Erhöhung der IL-1ß Konzentration bis auf 500 U/ml (siehe Tabelle: 4.4.4/1).

Tabelle 4.4.4/1: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe verschiedener IL-1ß Konzentrationen.

Experiment 21	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
R10	4950	3750	1200	100
IL-1ß 50 U/ml	12380	7000	5380	186
IL-1ß 100 U/ml	12750	10500	2250	280
IL-1ß 150 U/ml	6650	5000	1150	130
TNF-a 50 U/ml	8250	7150	1100	190
Experiment 22				
R10	7230	4600	2630	111
IL-1ß 50 U/ml	9900	6880	3030	149
IL-1ß 100 U/ml	6400	4900	1500	106
IL-1ß 500 U/ml	17000	12800	4200	278
TNF-a 50 U/ml	5800	4780	1020	103

Legende: Mausstamm: C57BL/6; Abliegezeit: 26 h; Inkubationszeit: 48 h; TNF-Konzentration: 50 U/ml; IL-1ß Konzentration: 50 U/ml, 100 U/ml, 150 U/ml, 500 U/ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Ich konnte beobachten, daß mit steigender IL-1ß Konzentration die Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen zunahm: die höchste Auswanderungsrate (278 %) konnte ich bei der Zugabe von 500 U/ml IL-1ß beobachten. Deshalb erhöhte ich auch die IL-1ß Konzentration in den folgenden drei Experimenten (Tabelle 4.4.4/2) in Kombination mit TNF-α, anti-IL-1ß und anti-TNF-α.

Tablle 4.4.4/2: Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen bei Zugabe von erhöhter IL-1ß Konzentration , TNF-α, anti-IL-1ß und anti-TNF-α.

Experiment 23	**Gesamt**	**DC**	**Andere**	**DC %**
R10	6750	4500	2250	100
TNF-α	7650	5000	2650	111
IL-1ß	9550	6750	2800	150
TNF-α + anti-IL-1ß	6200	4750	1450	105
IL-1ß + anti-TNF-α	20800	11810	8990	262
Experiment 24				
R10	8500	5000	3500	100
TNF-α	11500	8750	2750	175
IL-1ß	13150	9750	3400	195
TNF-α + anti-IL-1ß	4750	3750	1000	75
IL-1ß + anti-TNF-α	9750	7250	2230	145
Experiment 25				
R10	5500	3900	1600	100
TNF-α	9900	6700	3200	170
IL-1ß	7120	5250	1870	130
TNF-α + anti-IL-1	10380	7600	2750	190
ÍL-1ß + anti-TNF-α	7380	3250	4130	83
IL-12	8000	4100	3900	105
IL-12 + IL-1ß	8250	4750	3500	121

Legende: Mausstamm: C57BL/6; Abliegezeit: 26 h; Inkubationszeit: 48 h; TNF-α Konzentration: 50 U/ml; IL-1ß Konzentration: 100 U/ml (in Experiment 23), 500 U/ml (in Experiment 24 und 25); anti-IL-1ß Konzentration: 10 µg/ml; anti-TNF-α Konzentration: 0,3 mg/ml; IL-12 Konzentration: 1 ng/well. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde. Die Zellzahlen sind der Mittelwert der 6 Ohren bezogen auf eine Ohrhälfte.

Besonders in Experiment 24 wird der Einfluß der erhöhten IL-1ß Konzentration deutlich, doch auch in den beiden anderen Experimenten fand eine verstärkte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen statt. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.3 bezüglich der Zugabe von TNF-α und anti-IL-1ß, bzw. von IL-1ß und anti-TNF-α konnten auch in diesen drei Experimenten reproduziert werden. IL-12 zeigte keinen Einfluß auf die Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen.

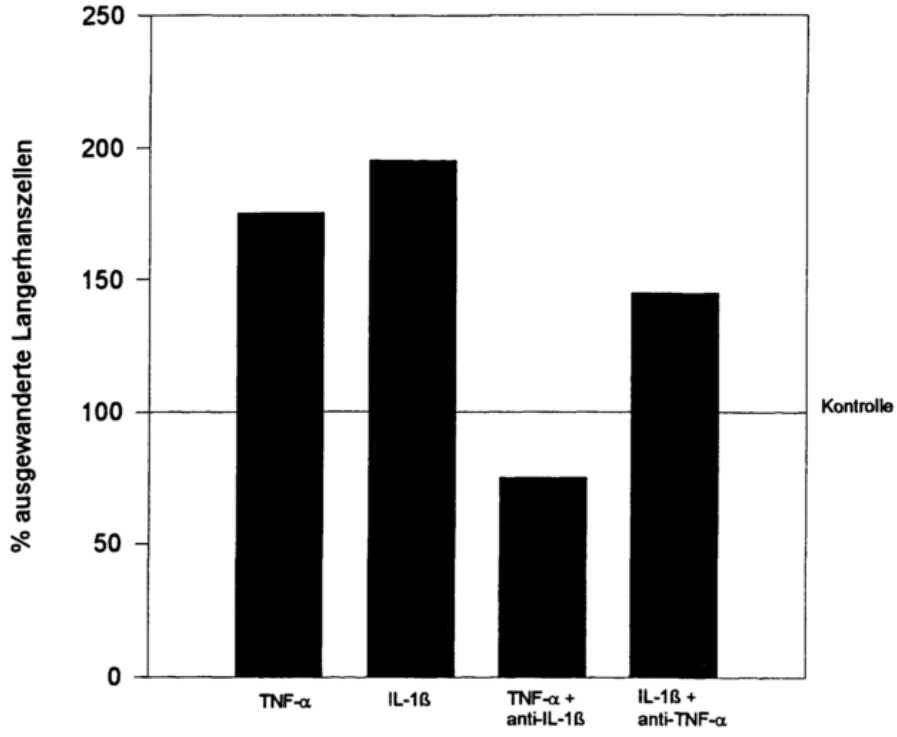

Abb. 4.4.4: Graphische Darstellung der Daten aus der Tabelle 4.44./2 des Experimentes 24: die Wirkung der erhöhten IL-1ß Konzentration (500 U/ml) auf die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen. Die Auswanderung ins Kulturmedium ohne Zusätze wurde als 100 % angenommen. (N=6)

4.5 Die Wirkung des CD40-Liganden auf die Viabilität und auf die Auswanderungsrate kutaner dendritischen Zellen.

4.5.1 Die Wirkung des CD40-L auf die Viabilität ausgewanderte kutaner dendritischer Zellen.

Der CD40-L ist ein Fusionsprotein aus der mCD8a-Kette und aus dem murinem CD40-T-Zell-Liganden (Der CD40-L wurde uns freundlicherweise von P. Lane, Basel, CH) geschenkt. Im Zusammenhang mit dendritischen Zellen ist es nun interessant, ob ein solches Membranprotein expremiert wird, bzw. in wieweit die Anwesenheit des CD40-Liganden die Viabilität dendritischer Zellen beeinflußt.

Im ersten Versuch (siehe Tabelle 4.5.1/1) inkubierte ich epidermale, 2 Tage alte (d2) ausgewanderte kutane dendritische Zellen (30000 DC/well) mit 0,3 ml CD40-L-Supernatant in einem Endvolumen von 1,5 ml R10 für 5 Tage. Als Kontrolle inkubierte ich ebenfalls epidermale, 2 Tage alte ausgewanderte kutane dendritische Zellen (30000 DC/well) ohne Zugabe des CD40-Liganden in einem Endvolumen von 1,5 ml R10.

Tabelle 4.5.1/1: Viabilität der kutanen dendritischen Zellen (d2) bei Zugabe von CD40-Ligand nach 5 Tage Inkubation bei 37 °C.

	Gesamt	DC	Andere	Morpholog. Bewertung
R10 +DC (Kontrolle)	57600	8100	49850	DC klein, wenig ausdifferenziert u. schwer unterscheidbar
R10 +DC +CD40L	55350	27900	27450	DC groß, gut ausdifferenziert- in Kult. einige Cluster

Legende: Mausstamm: BALB/c, kutane dendritische Zellen (d2): 30000 DC/well, Inkubationszeit: 5 Tage bei 37°C, 5 %CO_2; CD40-L-Konzentration: 0,3 ml/well

Laut diesen Ergebnissen führt die Zugabe des CD40-Liganden zu einer Erhöhung der Viabilität der dendritischen Zellen: nach 5 Tagen überleben in Anwesenheit des CD40-Liganden noch 93 % der kutanen dendritischen Zellen im Gegensatz dazu in reinem R10 nur 27 %.

In den folgenden Versuchen (Tabelle 4.5.1/2) wiederholte ich diese Versuchsanordnung mit verschiedenen Konzentrationen an dendritischen Zellen: 30000 dendrititsche Zellen/well, 50000 dendritische Zellen/well und 600000 dendritische Zellen/well, die restlichen Parameter ließ ich gleich.

Tabelle 4.5.1/2: Viabilität der kutanen dendritischen Zellen (d2) bei Zugabe des CD40-Liganden bei Verwendung verschiedener dendritischer Zell-Konzentrationen.

Experiment 23	**Gesamt**	**DC (30000/1,5 ml)**	**% DC**	**Andere**
R10 + DC (Kontrolle)	28750	10000	33	19375
R10 + DC +CD40-L	20000	13750	45	6250
Experiment 22		**DC (50000/1,5 ml)**		
R10 + DC (Kontrolle)	42000	25600	51	16400
R10 + DC + CD40-L	40000	32000	64	8000
Experiment 23		**DC (60000/1,5 ml)**		
R10 + DC (Kontrolle)	52500	33750	56	20000
R10 + DC+ CD40-L	61250	48750	81	12500

Legende: Mausstamm: BALB/c, kutane dendritische Zellen (d2): 30000 Zellen/well, 50000 Zellen/well und 60000 Zellen/well; Inkubationszeit: 5 Tage bei 37°C, 5 %CO_2; CD40-L: 0,5ml. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde.

Wie aus den Ergebnissen der Tabelle 4.5.1/2 ersichtlich ist scheint eine Zellzahl von 60000 Zellen/1,5 ml für Viabilitätsstudien am geeignetesten: bei Zugabe des CD40-Liganden ist die Überlebensrate um 25 % höher als ohne Zugabe.

In den nächsten Versuchen (Tabelle 4.5.1/3) wurde einerseits die Versuchsanordnung bei Verwendung von 60000 DC/1,5 ml wiederholt. Andererseits ist es bekannt, daß GM-CSF die Reifung von dendritischen Zellen und deren Viabilität erhöht. So müßte durch Zugabe von anti-GM-CSF die Überlebensrate der dendritischen Zellen erniedrigt werden und durch Zugabe von anti-GM-CSF und CD40-L wieder erhöht bzw. mindestens das Niveau der Kontrolle (dendritische Zellen in R10) erreicht werden. Da die von mir verwendeten dendritischen Zellen aus dem Ohr ausgewanderte Langerhanszellen waren, wäre es somit möglich, daß auch nur eine niedrige Konzentration von GM-CSF oder TNF-α sei es durch Anwesenheit einiger Keratinocyten oder auch durch die Langerhanszellen selbst im Kulturmedium vorhanden wäre. Um eine eventuelle viabilitätssteigernde Wirkung von GM-CSF und TNF–α auszuschalten, setzte ich anti-GM-CSF und anti-TNF–α hinzu.

Tabelle 4.5.1/3: Viabilität der kutanen dendritischen Zellen (d2).

Experiment 24	**Gesamt**	**DC**	**DC %**	**Andere**
R10 + DC (Kontrolle)	53750	36250	60	17500
R10 + DC +anti-GM-CSF	55000	35625	59	19375
R10 + DC +anti-GM-CSF + CD40-L	60000	46250	77	12500
Experiment 25				
R10 + DC (Kontrolle)	37500	27375	45	10125
R10 + DC +anti-GM-CSF+ anti-TNF–α	29625	23250	38	6375
R10 + DC + anti-GM-CSF +anti-TNF–α + CD40L	37500	24375	40	13125

Legende: Mausstamm: BALB/c, epidermal Langerhanszellen (d2) 60000Langerhanszellen/well; anti-GM-CSF Konzentration in Experiment 24: 10 µg/ml; anti-GM-CSF-Konzentration in Experiment 25: 13 µg/ml; anti-TNF–α Konzentration in Experiment 25: 0,2 mg/ml; CD40-L-Konzentration in beiden Experimenten: 0,3 ml/well; Inkubationszeit: 5 Tage bei 37°C, 5 %CO_2. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde.

Durch Zugabe von anti-GM-CSF (siehe Experiment 24) konnte keine Erniedrigung der Überlebensrate der kutanen dendritischen Zellen beobachtet werden, dafür jedoch durch Anwesenheit des CD40-Liganden eine Erhöhung derselben (um 17 % höher). Die Zugabe von anti-GM-CSF und anti-TNF–α verursachte zwar eine leichte Abnahme in der Überlebensrate (um 7 % niedriger), doch die Anwesenheit des CD40-Liganden konnte das Überleben der dendritischen Zellen nicht erhöhen (40 % gegen 45 % der Kontrolle).

Ich erwartete mir einen größeren Einfluß der Anti-Zytokine auf das Überleben der dendritischen Zellen. Ein möglicher Grund dafür, das dem nicht so war könnte darin liegen, daß die kutanen dendritischen Zellen schon nach 12 - 16 Stunden nach der Auswanderung ausreifen und dadurch weder die Zytokine noch Anti-Zytokine einen großen Einfluß auf die Viabilität haben können.

Deshalb versuchte ich in den folgenden Experimenten (Tabelle 4.5.1/4) verschieden alte kutane dendritische Zellen wiederum für 5 Tage ohne bzw. mit dem CD40-Liganden zu inkubieren, um festzustellen nach welcher Auswanderungszeit (Zeit des Auswandern: zwischen16 bis 96 Stunden) die dendritischen Zellen besser auf den CD40-Liganden ansprechen.

Tabelle 4.5.1/4: Viabilität bei verschieden weit herangereiften ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen mit und ohne CD-40-Liganden nach 5 Tagen Inkubation.

Experiment 26	**Gesamt**	**DC**	**DC %**	**Andere**	**Ausgangszellzahl**
R10 + DC (Kontrolle)	53500	4500	7	49000	30000 DC 16h
R10 + R10 + CD40-L	41000	8500	13	32500	30000 DC 16 h
Experiment 27					
R10 + DC (Kontrolle)	14500	10500	52	4000	20000 DC 24h
R10 + DC +CD40-L	9500	8000	40	1500	20000 DC 24h
R10 + DC (Kontrolle)	64000	49000	81	15000	60000 DC 48h
R10 + DC + CD40-L	47 00	34000	56	13000	60000 DC 48h
R10 + DC (Kontrolle)	19500	14500	41	5000	35000 DC 72h
R10 + DC +CD40-L	26000	21000	60	5500	35000 DC 72h
R10 + DC (Kontrolle)	9000	5250	52	3750	10000 DC 96h
R10 + DC + CD40-L	6750	6000	60	750	10000 DC 96h

Legende: Mausstamm: BALB/c, kutane dendritische Zellen: 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h DC-Konzentration siehe Tabelle; CD40-L in beiden Experimenten: 0,3ml/ml; Inkubationszeit: 5 Tage bei 37°C, 5 %CO_2. Die Zählung erfolgte im Hämocytometer von 5 Feldern, wobei jede Probe 3 Mal gezählt wurde.

Nach 16 Stunden Auswanderungszeit war der Anteil der dendritischen Zellen an der Gesamtzellzahl sehr niedrig, außerdem war es sehr schwierig beim Auszählen

immer eindeutig zwischen dendritischen Zellen und anderen Zellen zu unterschieden, da die dendritischen Zellen in diesem Stadium nur wenig ausdifferenziert waren. Nach weiterer Inkubation für 5 Tage mit und ohne den CD40-Liganden konnte bei dessen Anwesenheit eine erhöhte Überlebensrate (6 % mehr) beobachtet werden.

Nach 24 Stunden Auswanderungszeit war der Anteil der dendritischen Zellen an der Gesamtzellzahl beträchtlich höher und auch die Ausdifferenzierung der dendritischen Zellen war weiter fortgeschritten, was eine wesentliche Erleichterung in deren Unterscheidung mit sich brachte. Sowohl beim Versuchsansatz mit 24 Stunden als auch bei dem mit 48 Stunden nahm die Zahl der überlebenden dendritischen Zellen bei Anwesenheit des CD40-Liganden im Vergleich zur Kontrolle ab (zwischen 11 %-15 % weniger). Eine Erhöhung der Viabilitätsrate konnte nur bei jenem Versuchsansatz mit 72 Stunden und 35000 dendritischen Zellen/well beobachtet werden: 19 % mehr dendritische Zellen überlebten bei CD40-Ligand Anwesenheit als bei der Kontrolle ohne CD40-Liganden.

Insgesamt waren diese Ergbnisse z.T. recht wiedersprüchlich, obwohl in der Mehrzahl der Versuche die Anwesenheit des CD40-Liganden die Überlebensrate der dendritischen Zellen erhöhte.