

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten

Zanella, Monica

1995

5. Diskussion

5. Diskussion.

5.1 Optimierung des Organkultursystemes.

Optimierung der Inkubationszeiten:

Die höchste Auswanderungsrate an kutanen dendritischen Zellen wurde nach 48 Stunden Inkubationszeit festgestellt. Nach 24 Stunden und 30 Stunden waren die dendritischen Zellen zudem auch weniger ausdifferenziert: die in Suspension befindlichen Langerhanszellen hatten kaum ausgebildete Schleier oder "veils", waren noch klein und dadurch schwer von Keratinozyten und T-Lymphozyten zu unterscheiden. Durch eine längere Inkubationszeit konnten mehr Zellen aus der Epidermis durch die Dermis hindurch in das Kulturmedium auswandern und während ihres Weges bzw. im Medium selbst heranreifen. So wurden aus den kutanen unreifen dendritischen Zellen reife dendritische Zellen im Kulturmedium. Das Kulturmedium, in das die Zellen auswanderten, repräsentiert die lymphatischen Organe, in die die Langerhanszellen in vivo auswandern würden.

Verminderung der spontanen Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen:

In vorhergehenden Arbeiten [Dissertation von U. Ortner (101)] konnte schon beobachtet werden, daß eine Abliegezeit der Ohren bei 4°C die spontane Auswanderung geringer halten konnte. Wie aus den Experimenten 4.1.2 ersichtlich ist konnte beobachtet werden, daß eine Abliegezeit von 30 Stunden bei 4°C geeignet war. Denn es scheint, daß beim Abschneiden des Ohres eine Reihe von Reaktionen induziert werden, die die Konzentration der endogen produzierten Zytokine ansteigen läßt, sodaß die kutanen dendritischen Zellen verstärkt auswandern. Durch exogene Zugabe von Zytokinen und anti-Zytokinen in das Kulturmedium ohne Abliegezeit der Ohren konnte kein Einfluß auf die Auswanderung erzielt werden. Anders verhielt es sich jedoch, sobald die anti-Zytokine nach 30 Stunden Abliegezeit dem Kulturmedium zugegeben wurden: die Auswanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen war eindeutig niedriger. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens wäre, daß die dendritischen Zellen durch einen initialen Stimulus bzw. Trauma (Abschneiden der Ohren), den Anstoß zur Reifung und Auswanderung durch eine erhöhte Zytokinsynthese bekommen. Die Beobachtung, daß die intraperitoneale Gabe von neutralisierenden anti-TNF- α Antikörpern mehrere Stunden vor dem Abschneiden der

Ohren (d.h. vor dem Trauma) die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen hemmt, unterstützt diese Erklärungsmöglichkeit. Unter der Annahme jedoch, daß die Kühlung bei 4°C einerseits und die Abliegezeit andererseits zu einem Abbau der Zytokine führte, die z.B. von Keratinozyten gebildet worden sind, könnte man dann durch Zugabe von Zytokinen die unterbrochene Aktivierungskaskade wieder in Gang setzen oder durch anti-Zytokine blockieren. Die Möglichkeit, daß die Langerhanszellen schon während der Abliegezeit im Kühlschranks auswandern könnten, trifft nicht zu, da immunohistochemische Färbungen am Ende der Abliegezeit im Kühlschranks zeigten, daß die Dichte der Langerhanszellen am epidermalen Sheet unverändert war und in den dermalen Sheets keine Cords zu finden waren.

Ein Versuch zur Organkultur der Epidermis:

Die Langerhanszellen aus der Epidermis müssen, um in das Kulturmedium zu gelangen, durch die Dermis wandern. Dermale dendritische Zellen halten sich auch in der Dermis auf, die dann ebenfalls in das Medium auswandern. Es wäre interessant nur epidermale bzw. dermale und nicht ein Gemisch aus epidermalen und dermalen Langerhanszellen zu studieren. Deshalb wurde versucht die Epidermis von der Dermis zu trennen. Dafür wurden zwei unterschiedliche Methoden ausgetestet: Trennung der Epidermis von Dermis durch Dispase-bzw. Trypsin. Die Ergebnisse zeigen, daß durch die Trypsintrennung keine aktive Wanderung stattfand, sondern der Zellverband enzymatisch aufgelöst wurde und die Zellen inaktiv in das Medium gelangten. Die Dispasetrennung ermöglichte jedoch eine aktive Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis und Dermis: Die Zellzahlen der epidermalen ausgewanderten Langerhanszellen waren um das 7-fache höher als jene der dermalen ausgewanderten Langerhanszellen. Die Ausbeute an dermalen dendritischen Zellen wäre vergleichbar den Werten, die von M.Heine gefunden wurden (103,140). Die weitaus höhere Ausbeute an epidermalen dendritischen Zellen im Vergleich mit dermalen dendritischen Zellen ist unterschiedlich zum Humansystem. Dort konnten aus korrespondierender Dermis und Epidermiskultur ungefähr gleiche Zahlen an dendritischen Zellen erhalten werden (141).

Es war auch möglich durch Zugabe von Zytokinen (TNF- α) eine gesteigerte Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis zu erzielen, jedoch keine Hemmung über die Zugabe von anti-Zytokinen (anti-TNF- α). Warum schlußendlich alle folgenden Versuche mit Epidermis und Dermis zusammen gemacht wurden, beruht auf der Tatsache, daß bei der Trennung der Epidermis von der Dermis es kaum möglich war die Epidermis in einem Stück abziehen. Die Folge davon war, daß diese nur stückchenweise auf das Medium auflegt werden konnte und das Zurückrechnen der ausgewanderten Zellzahl pro Ohrhälfte nicht mehr möglich war.

Es wäre dennoch lohnend, unter den im Verlauf der weiteren Arbeit optimierten Reagenzien und Kulturbedingungen den Einfluß der Zytokine auf epidermale und dermale dendritische Zellen differentiell zu untersuchen

5.2 Exogen zugegebenes TNF- α stimuliert die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen in der Organkultur.

Es konnte deutlich gezeigt werden, daß in Organkultur zugefügtes rekombinantes murines TNF- α eine Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen aus der Epidermis und Dermis ins Kulturmedium bewirkt. Die Auswanderungsrate war von der TNF- α Konzentration abhängig, und zwar stimulierten niedere Konzentrationen von 50 U/ml bis 100 U/ml TNF- α die Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen bis zu 160 %. Hohe Konzentrationen hingegen von 1000 U/ml TNF- α hemmten die Auswanderung bis zu 35 %. Ein weiterer interessanter Aspekt war, daß die anti-TNF- α (0,3 mg/ml) Zugabe die migrationsstimulatorische Kapazität von 100 U/ml TNF- α aufheben konnte, was ein Beweis dafür ist, daß die kutanen dendritischen Zellen wirklich aufgrund des TNF- α auswandern. Auch konnte gezeigt werden, daß bei Zunahme der Zahl an kutanen dendritischen Zellen im Medium eine reziproke Abnahme der Langerhanszellen in den epidermalen Sheets stattfand und umgekehrt.

Ähnliche Befunde, die auch dem TNF- α in der Migration der Langerhanszellen eine wichtige Rolle zuschreiben, konnten von anderen Arbeitsgruppen erarbeitet werden:

M. Cumberbatch und I. Kimber (142,143) konnten zeigen, daß die intradermale Injektion von murinem rekombinantem TNF- α eine zeit- und konzentrationsabhängige Anreicherung der dendritischen Zellen in den Lymphknoten verursacht. Mit dem gleichzeitigen Anstieg der dendritischen Zellzahl in den Lymphknoten konnte eine Abnahme der Langerhanszellen in der Epidermis beobachtet werden, was daraus schließen läßt, daß die TNF- α Injektion eine Auswanderung der Langerhanszellen verursacht hat (143). Es ist unwahrscheinlich, daß die dendritischen Zellen im Lymphknoten aus dem Blut stammen, weil frühere klassische Experimente zeigen, daß ins Blut gespritzte dendritische Zellen nicht in den peripheren Lymphknoten wanderten (144). Schließlich kann die These aufgestellt werden, daß die lokale Produktion oder eine gesteigerte Produktion von TNF- α durch epidermale Zellen, wie z.B. Keratinozyten, oder auch andere Formen eines Traumas ein wichtiges Signal für die kutane dendritische Zell-Migration aus der Haut darstellen (123).

Senoo A. et al. (145) konnten in ihren ultrastrukturellen und immunohistochemischen Studien ähnliches nach intradermaler TNF- α Injektion in der Mausepidermis bzw. in den Lymphknoten feststellen: die epidermale NLDC-145+ Zellzahl in der Haut war nach TNF- α Behandlung geringer und die epidermale NLDC-145 + Zellzahl in den Lymphknoten gestiegen (NLDC-145 ist ein monoklonaler Antikörper, der als spezifischer Marker für DC verwendet wird.(146)). Aber auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß Langerhanszellen mit Birbeck Granula im marginalem Sinus und im Parakortex der Lymphknoten anzutreffen sind. Auch konnte gezeigt werden, daß Makrophagen im Lymphknoten Birbeck-Granula ähnliche Strukturen aufweisen und, daß im allgemeinen die Zahl der endozytotischen Strukturen und die der glatten und "coated" Vesikel in den Lymphknoten TNF- α behandelter Mäuse zunimmt.

Es gibt noch weitere Hinweise, daß das TNF- α in vitro und in vivo auf Langerhanszellen einen Einfluß ausübt: Koch et al. konnten zeigen, daß eine Zugabe von murinem TNF- α zu gereinigten Langerhanszellen deren Viabilität erhält ohne jedoch eine funktionelle Reifung hervorzurufen (88). Humanes TNF- α hatte jedoch unter denselben Bedingungen keinen Einfluß. Nicht nur hier konnte die speziesspezifische Selektivität von TNF- α auf die Langerhanszell-Funktion gezeigt werden, sondern beim intradermalen Spritzen von rekombinantem humanem TNF- α konnte kein Einfluß auf die Langerhanszell-Emigration beobachtet werden [Cumberbatch et al., (83)]. Im Gegensatz dazu konnten Austyn et al. auch bei intraperitonealer Injektion von humanem rekombinantem TNF- α in Mäusen eine Langerhanszell-Auswanderung beobachten, wobei diese beiden Ergebnisse im Widerspruch zueinander stehen. Streilein et al. konnten ebenfalls durch intradermale Injektion in Mäusen von murinem TNF- α eine rasche Abnahme der Langerhanszell-Dichte in der Epidermis beobachten. So können meine Daten z.T. auch von diesen Befunden bestätigt werden.

Es bleibt nun noch die Frage offen, warum im meinem System TNF- α in höheren Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Langerhanszell-Migration ausübt. Ein Grund dafür könnte sein, daß es toxisch auf die Langerhanszellen wirkt. Dagegen spricht, daß die in den Sheets zurückbleibenden Langerhanszellen nach immunohistochemischer Färbung intakt aussahen. Es gibt jedoch auch in der Literatur Evidenz dafür, daß TNF- α im Organismus toxische Auswirkungen haben kann. Verabreichung von Endotoxinen oder lebender Gram-negativer Bakterien an Menschen oder Tieren induziert die TNF- α Produktion. Die Gabe hoher Konzentrationen von TNF- α hat ähnliche Wirkungen wie man sie beim septischen Schock beobachten kann, und neutralisierende anti-TNF- α Antikörper kann die Tiere vor dem Tod durch den endotoxischen Schock schützen. Das beweist, daß TNF- α eine zentrale Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks spielt (147,148).

Obwohl die direkte Wirkung von TNF- α und von Zellen die durch TNF- α aktiviert werden (z.B. Neutrophile) wichtig ist, scheint die Wirkung von Mediatoren, die durch TNF- α induziert werden, wie z.B. IL-1 und IL-6, immer größere Bedeutung in der vermittelten Toxizität zu erlangen (149,150). In einem Tiermodell mit endotoxischem Schock konnte gezeigt werden, daß die zusätzliche Verabreichung eines IL-1 Antagonisten die Sterblichkeit reduzierte, ohne daß sich dadurch die TNF- α Konzentration im Serum veränderte (151). Zusätzlich konnte durch TNF- α Antikörper die durch das Endotoxin induzierte IL-1 und IL-6 Produktion geblockt werden (147). Weiters konnte in einigen Krankheits-Tiermodellen durch die neutralisierende Wirkung von anti-TNF- α Antikörper bestätigt werden, daß TNF- α als ein wichtiger Mediator in der Toxizität wirkt.

5.3 Endogenes TNF- α ist ein entscheidender Mediator der Migration kutaner dendritischer Zellen in der Organkultur.

Das gemischte *in vivo/in vitro* System bestehend aus der intraperitonealen Injektion von anti-TNF- α und anschließender Organkultur auf Kulturmedium bzw. auf Kulturmedium mit zugesetztem anti-TNF- α scheint für die Untersuchung der Wirkung von endogenem TNF- α auf die Migration der epidermalen Langerhanszellen aus der Ohrhaut geeignet zu sein. Aus der Ohrhaut von intraperitoneal behandelten Mäusen wanderten weniger dendritische Zellen aus, als aus denen von unbehandelten Mäusen. Noch weniger dendritische Zellen emigrierten, wenn die Ohrhälften zusätzlich in Anwesenheit von anti-TNF- α kultiviert wurden. Das bedeutet, daß einerseits schon das intraperitoneal gespritzte anti-TNF- α eine Hemmung der Langerhanszell-Migration bewirkte, aber daß die weitere Anwesenheit des anti-TNF- α im Kulturmedium während der Organkultur dieses Phänomen noch weiter verstärkte. Diese Daten korrelierten mit der immunohistochemischen Analyse. Bei den Ohren von mit anti-TNF- α behandelten Mäusen konnte eine eindeutige höhere Zahl an Langerhanszellen in den Sheets beobachtet werden als in den Sheets von den vergleichsweise unbehandelten Mäusen (Kontrollgruppe). Dies weist darauf hin, daß die anti-TNF- α Antikörper wahrscheinlich mit dem intrazellulären TNF- α interagieren, dieses nicht mehr an die Rezeptoren der Langerhanszellen binden kann und es so keinen Stimulus für die Auswanderung gibt. Es zeigt auch, daß TNF- α ein entscheidender Mediator für die spontane Migration der dendritischen Zellen in Kultur ist.

Die Nachspritzzeit, d.h. die Zeit zwischen dem Abschneiden der Ohren und dem Auflegen in Organkultur, die gute Beobachtungen der Langerhanszell-Migration zuläßt, betrug 16 Stunden. Kürzere Nachspritzzeiten von z.B. 3 und 6 Stunden ließen

keine reproduzierbaren Experimente zu. Wahrscheinlich war die Zeit zu kurz bemessen, als daß das intraperitoneal gespritzte anti-TNF- α an seinen Wirkort gelangen hätte können.

Um die biologische Relevanz dieser Befunde zu untermauern, wäre es wichtig zu wissen, ob in den Organkulturen tatsächlich TNF- α produziert wird. Darüber ist noch nichts bekannt. Es gibt aber Daten aus dem der Organkultur sehr ähnlichen System der experimentellen Kontakthypersensitivität. Dort werden tatsächlich die mRNA's von TNF- α und IL-1 β in Antwort auf das epikutane Auftragen von Kontaktallergenen hochreguliert (58,93).

5.4 IL-1 β stimuliert die Auswanderung kutaner dendritischer Zellen in die Organkultur.

Ähnlich wie TNF- α führte auch IL-1 β ab Konzentrationen von größer als 50 U/ml zu einer gesteigerten Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen. Bei 50 U/ml betrug sie 139 % vom Kontrollwert. Somit konnte der positive Effekt von IL-1 β auch in Organkultur bestätigt werden.

Durch Zugabe von anti-IL-1 β konnte der stimulatorische Effekt von exogen zugegebenem IL-1 β gehemmt werden (siehe dazu Kapitel 4.4.3). Das weist darauf hin, daß die kutanen dendritischen Zellen spezifisch auf das IL-1 β ansprechen. Es erlaubt den Schluß, daß IL-1 β wie TNF- α , ein wichtiger Impuls für die Langerhanszell-Auswanderung ist.

Außerdem wurde der stimulatorische Effekt auf Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen auch durch intraperitoneales Spritzen von IL-1 β getestet, da schon ähnliches bei TNF- α beobachtet werden konnte. Doch wie die Ergebnisse in Kapitel 4.4.2 zeigen konnte trotz Änderung verschiedener Parameter wie z.B. die IL-1 β Konzentration und Nachspritzzeit keine signifikante Beeinflussung der Langerhanszell-Migration beobachtet werden. Wahrscheinlich ist das darauf zurückzuführen, daß IL-1 β ein inflammatorisches Zytokin ist und intraperitoneal verabreicht eine Reihe von Reaktionen auslöst, die keine eindeutigen und reproduzierbaren Aussagen zulassen. Es könnte jedoch auch möglich sein, daß die verabreichten IL-1 β Konzentrationen nicht hoch genug waren (Vergleich dazu (92), und ich somit die Auswirkungen auf die Langerhanszellen in der Ohrepidermis nicht beobachten konnte.

Nylander-Lundqvist et al (92) beobachteten die Dichte und Morphologie von epidermalen dendritischen Zellen in Mäusen nach intrakutaner Injektion von rekombinantem IL-1 β . Sie konnten feststellen, daß dies eine Abnahme der Langerhanszell-Dichte nach 2-7 Tagen nach Injektion des Zytokins verursachte.

Außerdem konnten sie beobachten, daß die zurückbleibenden dendritischen Zellen größer waren und eine vermehrte MHC-Klasse-II Expression aufwiesen. Das zeigt, daß in vivo Verabreichung von IL-1 β in Form von intrakutaner Injektion einen stimulatorischen Effekt auf die Langerhanszell-Auswanderung ausübt und, daß es auch die Reifung der Langerhanszellen unterstützt, da die MHC-Klasse-II-Expression 10 bis 36 mal intensiver als bei unbehandelten Langerhanszellen war. Außerdem konnten sie auch eine zeitabhängige Abnahme der Langerhanszellen beobachten, und zwar scheint die Abnahme der Langerhanszellen nach 24 h einzusetzen, ihren Höhepunkt nach 2 Tagen zu erreichen und nach 5 Tagen war keine Abnahme der Langerhanszellen mehr zu beobachten. Das läßt somit die Spekulation zu, daß die Langerhanszell-Aktivierung einer zeitlichen Abfolge gehorcht. Ähnliches konnten auch Enk und Katz (58,93) beobachten: nach intradermaler Injektion von 25 ng IL-1 β konnten sie nach 15 Minuten die mRNA von IL-1 β und nach 30 Minuten die von TNF- α messen, und mittels immunohistochemischen Färbungen der Sheets konnten sie zeigen, daß die Dichte der Langerhanszellen von IL-1 β behandelte Haut deutlich geringer war. In vivo kann die IL-1 β Produktion von epidermalen Zellen auch durch UV-Bestrahlung erhöht werden (152), und als Folge kann man eine Abnahme in der Dichte der ATPase positiven und Birbeck-Granula tragenden Langerhanszellen beobachten (153-155). Die zurückbleibenden ATPase positiven Langerhanszellen waren eindeutig vergrößert, mit verlängerten dendritischen Ausläufern. Diese Ergebnisse zusammen lassen vermuten, daß sei es UV-Bestrahlung als auch IL-1 β die Morphologie der Langerhanszellen über die gleichen Mechanismen steuert. Auch eine parakrine und autokrine Regulation über IL-1 β kann nicht ausgeschlossen werden.

5.5 Eine Zytokinkaskade aus TNF- α und IL-1 β könnte die Migration steuern.

Abschließend wurden Experimenten durchgeführt, in denen TNF- α und IL-1 β sowie anti-TNF- α und anti-IL-1 β kombiniert in allen möglichen Kombinationen getestet wurden. In dieser Versuchsreihe wurde versucht aufzuklären wie möglicherweise IL-1 β und TNF- α auf eine Langerhanszell-Migration wirken könnten. Wie aus der Abb. 4.4.3 ersichtlich ist, konnte ich bei Zugabe von TNF- α eine Erhöhung der Langerhanszell-Migration von 182% beobachten. Mit anti-TNF- α konnte die Emigration auf 58 % vermindert werden und in Anwesenheit von beiden erreicht die ausgewanderte Langerhanszell-Zahl ungefähr die gleichen Werte wie die der Kontrolle. Die Zugabe von IL-1 β bewirkte eine Zunahme der Migration von 140 % und durch gleichzeitige Zugabe von anti-IL-1 β konnte wieder der Level der Kontrolle erreicht werden. Interessant ist die Tatsache, daß bei Zugabe von IL-1 β und

anti-TNF- α die Auswanderung 110 % und bei Zugabe von TNF- α und anti-IL-1 β die Auswanderung 81 % beträgt. Diese Ergebnisse möchte ich im folgenden genau diskutieren und interpretieren.

Heufler und Topar konnten zeigen, daß IL-1 β in erster Linie von Langerhanszellen produziert wird. Die mRNA für IL-1 β wird während der Kultur von Langerhanszellen (d3) stark aufreguliert. Auch exprimieren Langerhanszellen während Kultur die mRNA für die pro-inflammatorischen Zytokine MIP-1a und MIP-2 (60).

Es liegen auch zahlreiche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen vor, die IL-1 β eine wichtige Rolle in der Langerhanszell-Migration zuschreiben:

Enk und Katz (58,93) beobachteten, daß ein frühes Zeichen der Langerhanszell-Aktivierung in vivo in der Zunahme von IL-1 β mRNA besteht, welche schon 15 Minuten nach Kontaktallergenexposition auftritt. Das bestätigt auch die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen (60), die eine gleichartige Hochregulation während der Kultur fanden. Um den Effekt von IL-1 β genauer zu untersuchen, spritzten sie dieses Zytokin intradermal in die Ohren von BALB/c Mäusen und extrahierten vier Stunden später die gesamte epidermale RNA. Zum Vergleich wurden auch IL-1 α und TNF- α gespritzt, bzw. Kontaktallergen (3 % TNCB) appliziert. Anschließend wurden die Veränderungen in der Expression der mRNA für verschiedene Zytokine und MHC-Klasse-II verglichen (Methode: quantitative, reverse-Transkriptase-PCR) (93). Hierbei zeigte sich, daß nach Injektion von 25 ng IL-1 β die Signale für die mRNA von IL-1 α , IL-1 β , MIP-2, IL-10, TNF- α und MHC-Klasse II um des 5-100-fache anstiegen, was dem RNA-Zytokin-Profil nach Kontaktallergenexposition ähnelte. Weiters waren die Langerhanszellen aus mit IL-1 β gespritzter Haut 2-3 mal stärker in den funktionellen Proliferationsassays als die Langerhanszellen der unterschiedlich behandelten Haut. Anhand gefärbter Sheets konnten sie auch die Bedeutung von IL-1 β für die Auswanderung demonstrieren: die Dichte der Langerhanszellen in IL-1 β behandelter Epidermis war deutlich verringert. Injektionen von IL-1 α oder TNF- α veränderten das epidermale Zytokinprofil unwesentlich. TNF- α sowie GM-CSF-mRNA erhöhten sich in epidermalen Zellen als Antwort auf Allergen wie auch auf Irritantien. Dies zeigt, daß intradermales injizierte IL1 β die IL-1 β Produktion von Langerhanszellen in autokriner Weise induzieren kann, aber auch die Expression anderer Zytokine hinaufreguliert. Es läßt sich die Hypothese aufstellen, daß nach Kontaktsensibilisierung eine rasche Induktion bzw. erhöhte IL-1 β Produktion stattfindet und, daß dieses Zytokin in einer parakrinen Art und Weise die TNF- α Sekretion von Keratinozyten stimuliert. TNF- α wiederum interagiert direkt mit den Langerhanszellen und stimuliert deren Migration aus der Epidermis (siehe Abb.5.4).

Wie die Daten der verschiedenen Gruppen zeigen, scheinen IL-1 β und TNF- α wichtige Faktoren in der epidermalen Langerhanszell-Auswanderung zu sein. Trotz

allem sollte nicht vergessen werden, daß eine Zunahme der mRNA nicht immer mit einer Produktion und Sekretion der Zytokine gleichzusetzen ist. Auch muß das nicht immer bedeuten, daß die Zytokine dann auch in einer biologisch aktiven Form vorhanden sind.

Neuere Studien haben noch eine zweite Facette des schon recht komplizierten Systems aufgedeckt: wie schon in der Einleitung erwähnt wird außer dem IL-1 α und IL-1 β ein drittes Protein, der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) exprimiert (156). Der IL-1ra besitzt eine hohe Affinität zu beiden Rezeptoren und wirkt somit kompetitiv zu IL-1. Keratinozyten besitzen eine Form des IL-1ra dem die Leadersequenz und das Signalpeptid fehlt, sodaß es ähnlich wie die Vorstufen von IL-1 α und IL-1 β nicht effizient von den Zellen expremiert werden kann (157,158). Nach Verletzungen der Epidermis jedoch werden IL-1 und IL-1ra sezerniert, wobei die IL-1ra Konzentration in Keratinozyten-Kultur öfter höher ist als jene von aktivem IL-1 α (157). Es konnte gezeigt werden, daß eine Reihe von Zellen nur sehr wenige besetzte IL-1 Rezeptoren benötigen, damit das IL-1 Signal aufgefaßt wird (118). So kann man das kompetitive Verhalten von einer hohen Konzentration von IL-1ra mit dem aktiven IL-1 um wenige IL-1 Rezeptoren beobachten. Außerdem können die meisten Zellen, die den IL-1 Rezeptor Typ II exprimieren auch in niederen Konzentrationen den Typ I Rezeptor expremieren, und in den letzten Studien von Kupper [unveröffentliche Daten] gibt es Hinweise, daß Keratinozyten sogar beide IL-1 Rezeptoren exprimieren können.

Zusammenfassend scheinen also aktivierte Keratinozyten folgende Merkmale zu haben: sie regulieren die IL-1 α , IL-1 β Genexpression und die IL-1 Rezeptor Typ I Expression hinauf. Gegensätzliche Ereignisse dazu sind die IL-1ra Expression und die Aufregulierung des Typ II IL-1 Rezeptors, der als indirekter Inhibitor zu IL-1 β stehen kann.

Nun gibt es auch einige Evidenz in der epidermalen Zytokinproduktion, insbesondere von IL-1 und TNF- α , die darauf hinweisen, daß es sogenannte primäre und sekundäre Zytokine gibt. So könnte man die primären Zytokine als solche beschreiben, die die Fähigkeit besitzen als Antwort auf Entzündungen oder Traumata in immunologisch kompetenten Zellen "sekundäre" Zytokine und weitere Mediatoren zu induzieren. Zu solchen Zytokine kann man sicherlich IL-1 und TNF- α zählen, die sei es in autokriner als auch in parakriner Weise eine gegenseitige Induktion bewirken, und außerdem noch die Regulation von Rezeptoren, weiteren Zytokinen wie z.B. GM-CSF und Adhäsionsmolekülen beeinflussen.

Ausgehend von dieser Hypothese und auch von dem in der Biologie immer wiederkehrenden Mechanismus der offenen Systeme, in der Induktion und Repression zu einander im Wechselspiel stehen um eine sinnvolle Anpassung an äußere Umstände zu gewährleisten, möchte ich nun versuchen in vier Schritten ein Modell einer

Zytokinkaskade vorzustellen, die die Migration und sicherlich auch die Reifung der epidermalen Langerhanszellen beeinflusst.

1. Wie aus Abb.4.4.3 ersichtlich ist konnte bei niedrigen TNF- α Konzentrationen (weniger als 100 U/ml) eine gesteigerte Auswanderung beobachtet werden, mit anti-TNF- α Antikörper konnte dieser Effekt gehemmt werden. Es ist anzunehmen, daß das zugegebene TNF- α einerseits einer LPS Zugabe entspricht und wie bekannt ist, dies in den Keratinozyten zu einer vermehrten IL-1 α , IL-1R1 und IL-1ra Expression führt und andererseits das TNF- α direkt auf die Langerhanszellen wirkt und dort ebenfalls eine gesteigerte IL-1 β und IL-1ra Expression induziert. Insgesamt steigt die IL-1 Konzentration, was wiederum über die Expression von GM-CSF-Rezeptoren auch die Reifung begünstigt.

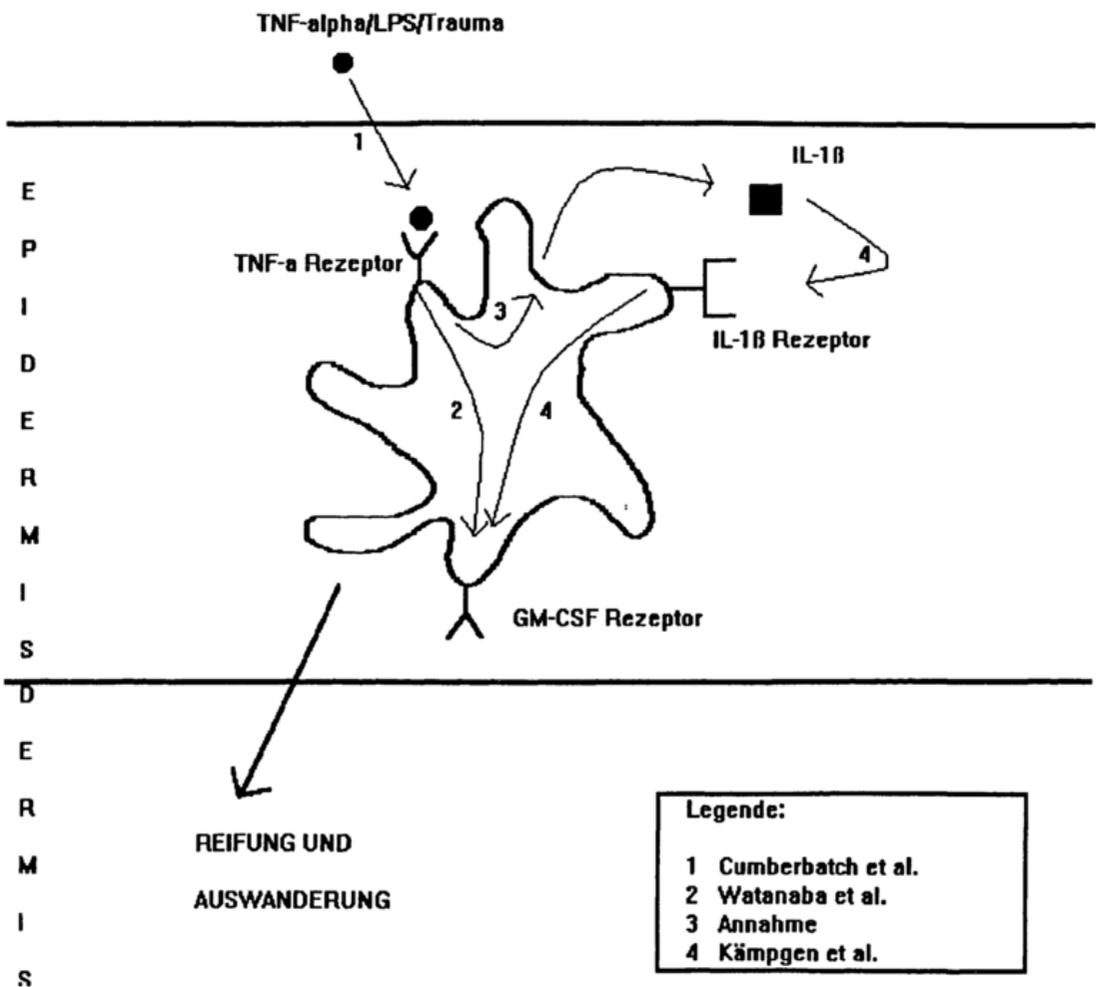


Abb. 5.5/1: Modell zur Wirkung von TNF- α auf die Emigration kutaner dendritischer Zellen in Organkultur.

2. Die IL-1 β Zugabe bewirkte ebenfalls eine vermehrte Langerhanszell-Migration und die anti-IL-1 β Antikörper Zugabe eine Verminderung. Auch hier bindet das IL-1

an die IL-1 Rezeptoren der Langerhanszellen und wirkt auf ähnliche Weise auf die Migration wie oben besprochen.

Abb2.

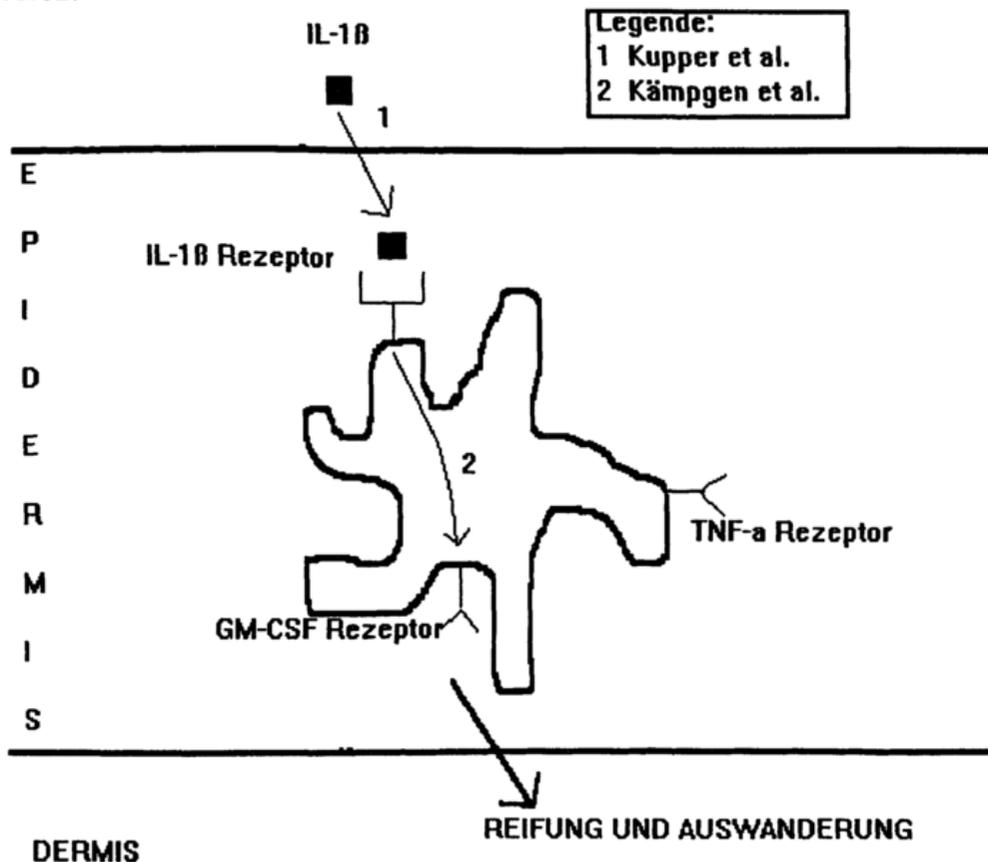


Abb.5.5/2: Modell zur Wirkung von IL-1 β auf die Emigration kutaner dendritischer Zellen

3. Bei der Zugabe von IL-1 β und anti-TNF- α Maus Antikörper bindet der anti-TNF- α Antikörper das lösliche TNF- α , so daß es nicht an den entsprechenden Rezeptoren binden kann. Das IL-1 β alleine hingegen kann eine gesteigerte Auswanderung induzieren.
4. Bei Zugabe von TNF- α und anti-IL1 β wird das IL-1-1 β , welches von TNF- α induziert wird, vom IL-1 Antikörper abgeblockt, sodaß es an den IL-1 Rezeptoren nicht binden kann. TNF- α alleine scheint aber nicht zu genügen, um eine erhöhte Auswanderung der epidermalen Langerhanszellen zu bewirken.

Diese Befunde lassen die Spekulation zu, daß für eine erhöhte Auswanderung kutaner dendritischer Zellen das TNF- α eine IL-1 β Expression induziert. Es wäre möglich, daß exogen zugegebenes TNF- α (LPS oder Trauma) sogar das IL-1 β Konvertase Enzym (ICE) hinaufreguliert und, daß als Folge davon biologisch aktives

IL-1 β von der Langerhanszelle selbst ausgeschüttet wird und an die spezifischen Rezeptoren bindet. Der Stimulus zur Auswanderung wäre damit gegeben. Auch scheint es möglich, daß das IL-1 β sehr wohl *alleine* (d.h. wenn TNF- α neutralisiert wird) einen Stimulus für die Auswanderung setzen kann (Schritt 3). TNF- α allein kann jedoch *nicht* eine erhöhte Auswanderung induzieren, da die Anwesenheit von IL-1 β notwendig zu sein scheint (Schritt 4).

In diesem komplexen Zusammenspiel der Zytokine darf die Rolle der Adhäsionsmoleküle wie z. B. E-cadherin nicht außer acht gelassen werden, da auch sie im Mechanismus der Migration einen wichtigen Platz einnehmen. Insgesamt ergibt dies ein Bild eines sehr komplexen und interagierenden Systems, indem sicherlich nicht ein Faktor alleine sondern eine Vielzahl von verschiedenen positiv und negativ wirkenden Mechanismen eine wichtige Rolle spielen. So soll diese Zytokinkaskade nur eine mögliche Erklärung für eine Migration der kutanen dendritischen Zellen darstellen.

5.6 Einfluß von Adhäsionsmolekülen, Integrine und Chemotaxis auf das migratorische Verhalten der kutanen dendritischen Zellen.

Da TNF- α und IL-1 β ein mögliches Signal für die Migration der kutanen dendritischen Zellen sein könnten, ist es interessant die Veränderungen der Zellen näher zu betrachten. Eine wichtige Rolle dabei spielt sicherlich die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. des E-cadherins, das von Langerhanszellen und Keratinozyten expremiert wird. Es wird angenommen, daß durch einer verminderten Expression des E-cadherins die Langerhanszellen sich von den adherenten Keratinozyten lösen können und, daß dies einen wichtigen ersten Schritt in der Migration der Langerhanszellen aus der Epidermis darstellt (112). Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß kultivierte Langerhanszellen weniger E-cadherin expremieren als frisch isolierte und damit eine geringere Affinität zu Keratinozyten besitzen (112). Weiters wurde gezeigt, daß die Applikation von Kontaktallergen sowie die intradermale Injektion von TNF- α und Il-1 β zu einer Abnahme der E-cadherin Expression auf Langerhanszellen führt (159).

Ein anderes Adhäsionsmolekül, CD44, ist von großer Bedeutung. Die Expression dieses Moleküls beeinflußt die Beweglichkeit und die migratorische Aktivität von verschiedenen Zelltypen. Nach einer Behandlung von kultivierten dendritischen Zellen mit TNF- α konnte eine erhöhte Expression des CD44-Moleküls beobachtet werden (131).

Auch Integrine, sogenannte Zelloberflächen-Adhäsions-Rezeptoren, repräsentieren einen wichtigen Mechanismus in der Interaktion zwischen Zellen und

extrazellulärer Matrix. Murine Langerhanszellen besitzen z.B. das $\alpha 4$ Integrin. Eine sehr interessante Beobachtung ist die erhöhte $\alpha 4$ Integrin Expression während der Kultur von Langerhanszellen und, daß antigenträgende dendritische Zellen im Lymphknoten von hautkontaktsensibilisierten Mäusen dieses Molekül exprimieren (115). Im Maussystem konnte noch nicht gezeigt werden, daß TNF- α die $\alpha 4$ Integrin Expression stimuliert, im Humansystem konnte jedoch gezeigt werden, daß TNF- α die $\alpha 6$ -Integrin Expression auf Langerhanszellen induziert (160).

Diese Daten zeigen, daß TNF- α auch die Expression von Integrinen und Adhäsionsmoleküle beeinflusst, die während der Wanderung und besonders am Beginn der Migration sicherlich eine wichtige Rolle spielen und, daß TNF- α auch die Produktion anderer Zytokine (IL-1, IL-6, GM-CSF) induziert, die ebenfalls einen positiven Einfluß auf die Migration ausüben.

Für eine gerichtete Migration der Langerhanszellen aus der Epidermis durch die Dermis bis hin in die Lymphknoten spielt auch die Chemotaxis eine wichtige Rolle. Kobayashi et al.(161) konnten in ihren Experimenten zeigen, daß der Kontakt zwischen Langerhanszellen und Hapten, nach Allergenkontakt, ein Stimulus für die Langerhanszell-Migration sein könnte und, daß von den dermalen Fibroblasten stammende Faktoren die gerichtete Migration der Langerhanszellen von der Epidermis durch die Dermis regulieren.

Damit antigenträgende Langerhanszellen aus der Epidermis zu den Lymphknoten gelangen, müssen sie zunächst durch die extrazelluläre Matrix wandern. M. J. Staquet et al. (162) stellten fest, daß Langerhanszellen fähig sind sich an den Proteinen der extrazellulären Matrix zu binden. Ist einmal der Kontakt mit den Proteinen der extrazellulären Matrix hergestellt, verlieren sie ihre Fähigkeit sich an das Laminin der Basalmembran zu binden, was einen erneuten Eintritt der Langerhanszellen in die epidermalen Kompartimente verhindert. So postulieren sie, daß der Kontakt zwischen epidermalen dendritischen Zellen und extrazellulärer Matrix und die Adhäsionsaffinität zu Epidermis und Dermis die Richtung der Langerhanszell-Migration reguliert

5.7 Die Wirkung des CD40-Liganden auf die Viabilität und auf die Auswanderungsrate kutaner dendritischer-Zellen.

Um eine Antwort auf die erste Fragestellung zu geben, wird es nötig sein, die Ergebnisse aus dem Kapitel 4.5.1 zunächst zu vergleichen: Aus den Ergebnissen der ersten Versuche scheint klar hervorzugehen, daß durch die Zugabe des CD40-Liganden die Viabilität der dendritischen Zellen im Vergleich derer ohne Zugabe des CD40-Liganden erhöht wird. Das läßt nun darauf schließen, daß auch epidermale

Langerhanszellen das CD40-Protein exprimieren, wobei der Zeitpunkt der Expression, ob während der Migration oder während der Kultur, nicht bekannt ist.

Im Experiment 24 wurde durch Zugabe von anti-GM-CSF versucht, die Viabilität der DC zu erniedrigen bzw. durch gleichzeitige Zugabe vom CD40-Ligand zu erhöhen. Das gleiche Experiment mit anti-TNF- α (Experiment 25) ließ keine Steigerung der Viabilität durch gleichzeitige Zugabe des CD40-Liganden zu. Das läßt sich dadurch erklären, daß der CD40-Ligand dem TNF- α sehr ähnlich ist, und wahrscheinlich das anti-TNF- α den CD40-Liganden absättigt, sodaß dieser keine Bindung mit dem CD40-Molekül auf den dendritischen Zellen eingehen kann.

Aus dem Ergebnis des Experiments 27 ist ersichtlich, daß d3 und d4 ausgewanderte Langerhanszellen besser auf den CD40-Liganden ansprechen als jene von d1 und d2. Es könnte dadurch erklärt werden, daß ältere und damit reifere ausgewanderte kutane dendritische Zellen mehr CD40-Membranmoleküle exprimieren und somit eine größere Wechselwirkung zwischen CD40 und CD40-Liganden herrscht als bei jenen, die noch nicht herangereift sind.

Eine Expression des CD40-Liganden während der Migration und Reifung scheint biologisch sehr sinnvoll zu sein, denn erst auf dem Weg zu den lymphatischen Geweben bzw. in den lymphatischen Geweben stoßen die nun zu dendritischen Zellen herangereiften Langerhanszellen auf T-Zellen. Da nun die T-Zellen den CD40-Liganden exprimieren, können sie mit den aktivierten und antigenpräsentierenden dendritischen Zellen in Wechselwirkung treten, und sowohl über T-T-Zellkontakte und induzierter IL-2 Produktion die T-Zell-Proliferation steigern, als auch über dendritische Zell-T-Zellkontakte die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion steigern. So scheint es auch sinnvoll, daß antigenpräsentierende dendritische Zellen durch die CD40/CD40-Ligand Wechselwirkung länger überleben und am Wirkort bleiben, um möglichst lange T-Zellen zu stimulieren. Wahrscheinlich können die CD40-Ligand tragenden T-Zellen ebenso mit aktivierten B-Zellen in Wechselwirkung treten und das B-Zellwachstum sowie die Ig-Synthese induzieren. Die Expression des CD40-Membranproteins auf dendritischen Zellen würde somit die Einleitung der primären Immunantwort verstärken und als Kostimulator dienen.

Für die Beantwortung der zweiten Frage müssen zunächst die Ergebnisse des Kapitels 4.5.2 interpretiert werden: Die Ergebnisse aus den Experimenten 28 und 29 zeigen, daß in Anwesenheit vom CD40-Ligand eine Verminderung der Migrationsrate kutaner dendritischer Zellen stattfand. Aus den Experimente 30, 31 und 32 geht hervor, daß die Auswanderung der Langerhanszellen anscheinend von der Konzentration des dazugegebenen CD40-Liganden abhing. Eine Konzentration von 125 μ l/well CD40-Ligand hatte in beiden Fällen eine Steigerung der Migrationsrate von mehr als 200 % bewirkt, höhere Konzentrationen scheinen eine Migration zu hemmen. Für diesen Effekt könnte es zwei Erklärungen geben.

Erstens: Der CD40-Ligand wirkt in ähnlicher Weise auf die Migration wie das TNF- α , das auch eine konzentrationsabhängige Migration der Langerhanszellen bewirkt. Durch Bindung des CD40-Liganden an das CD40-Membranprotein werden vielleicht spezifische Abläufe in Gang gesetzt wie z.B. eine Induktion der Zytokinsynthese, die ähnlich dem TNF- α oder anderen inflammatorischen Zytokinen ein Auswanderung bewirken.

Zweitens: Da das CD40-Membranprotein der TNF- α -Rezeptor Superfamilie angehört, könnte die Möglichkeit bestehen, daß der CD40-Ligand anstatt eine Bindung mit dem CD40-Molekül einzugehen, sich an dem TNF- α -Rezeptor bindet und somit eine echte TNF- α /TNF- α -Rezeptor Bindung vortäuscht. Wie im vorangegangenen Teil gezeigt wurde, induziert das TNF- α auch in niedrigen Konzentrationen die Langerhanszell-Migration. Zu dieser Spekulation käme auch noch hinzu, daß eine Expression des CD40-Moleküls auf epidermalen Langerhanszellen nicht sehr sinnvoll erscheint, da ja die CD40-Ligandtragenden T-Zellen nicht in der Epidermis vorkommen. Leider konnte ich nicht zeigen, ob Keratinozyten den CD40-Liganden exprimieren; wäre dies der Fall so ergebe eine CD40-Expression auf epidermalen Langerhanszellen wieder einen Sinn.