

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Regulation der Migration von murinen kutanen dendritischen Zellen durch bakteriell und Kontaktallergeninduzierte Zytokine

Stoitzner, Patrizia

1997

Inhaltsverzeichnis

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12558](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12558)

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....	1
1 Das System der dendritischen Zellen.....	1
1.1 Die Entdeckung.....	1
1.2 Herkunft und Vorkommen	1
1.3 Phänotyp der dendritischen Zellen.....	2
1.4 Funktionen der dendritischen Zellen	4
1.4.1 Wächterfunktion	4
1.4.2 Migratorische Funktion.....	4
1.4.3 Adjuvansfunktion.....	4
2 Die Haut als Immunorgan (<i>skin-associated lymphoid tissue</i> , SALT)	5
2.1 Aufbau der Haut	5
2.2 Die dendritischen Zellen der Haut.....	7
2.3 Zytokinproduktion in der Haut	7
2.3.1 Zytokinproduktion der Keratinozyten.....	8
2.3.2 Zytokinproduktion in Langerhanszellen.....	8
2.4 Beeinflussung der Wanderung kutaner dendritischer Zellen durch in der Haut gebildete Zytokine.....	9
3 Zielsetzung der Diplomarbeit.....	11
3.1 Optimierung der Organkultur.....	11
3.2 Einfluß der inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen	12
3.3 Lipopolysaccharide als Induktoren der Wanderung	12
3.4 Die Rolle von MIP-1 α bei der Migration	13
3.5 IL-10 und IL-4 als inhibitorische Zytokine für kutane dendritische Zellen	13
3.6 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur	14
3.7 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen und der Haut nach der Organkultur	14
3.7.1 Immunfluoreszenz.....	15
3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	15
B. Material und Methoden	16
1 Materialien, Zytokine, Antikörper, Geräte	16
1.1 Materialien.....	16
1.2 Zytokine.....	17
1.2.1 Zytokine für die Organkultur.....	17
1.2.2 Standards für Elisa.....	17
1.3 Antikörper.....	18
1.3.1 Antikörper für die Organkultur	18

1.3.2	Antikörper für Elisa.....	18
1.3.3	Antikörper für die Färbungen von <i>sheets</i> und Zytozentrifugationen.....	19
1.4	Geräte	20
2	Lösungen.....	21
2.1	Medium für die Organkultur.....	21
2.2	Lösungen für die Kultur epidermaler Zellsuspensionen	21
2.3	Lösungen zur Herstellung von epidermalen <i>sheets</i>	22
2.4	Lösungen für die Färbung epidermaler und dermaler <i>sheets</i> und der Zytozentrifugationen.....	22
2.5	Lösungen für Elisa	22
2.5.1	Lösungen für GM-CSF- und TNF α -Elisa.....	22
2.5.2	Lösungen für den IL-1 β -Elisa.....	23
2.6	Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie	24
3	Methoden	25
3.1	Organkultur	25
3.2	Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.3	Herstellung angereicherter Populationen epidermaler Langerhanszellen.....	26
3.3.1	Herstellung der Zellsuspension.....	26
3.3.2	Depletion eines Großteils der Keratinozyten.....	26
3.3.3	„Trypsin-Trick“	27
3.3.4	Kultur der epidermalen Zellsuspension.....	27
3.4	Herstellung epidermaler und dermaler <i>sheets</i>	27
3.5	Färbungen epidermaler <i>sheets</i>	28
3.5.1	Immunfluoreszenzfärbung	28
3.5.2	Peroxidase-Färbung	28
3.6	Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten	29
3.7	Färbungen von Zytozentrifugationen.....	29
3.8	Funktionelle Tests	30
3.9	Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay).....	30
3.9.1	Sandwich-Elisa für TNF α und GM-CSF	30
3.9.2	Sandwich-Elisa für IL-1 β	32
3.10	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	33
3.10.1	REM von epidermalen <i>sheets</i> und kompletter muriner Ohrhaut	33
3.10.2	REM der Zellkulturen	33
C.	Ergebnisse.....	34
1	Optimierung der Organkultur	34
1.1	Änderung der Bedingungen während der Vorinkubation.....	34
1.2	Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite nach unten auf R10-Medium mit Zytokinen und Antikörpern.....	38
1.3	Zusammenfassung zur Optimierung der Organkultur	40

2	Untersuchungen zur Wanderung der Langerhanszellen	41
2.1	TNF α kann in der Organkultur die Migration der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen	41
2.1.1	Die TNF α -Wirkung ist dosisabhängig	41
2.1.2	Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen von TNF α	44
2.1.3	Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNF α in die Kultur hemmt die Migration der kutanen dendritischen Zellen	48
2.1.4	Morphologische Aspekte	51
2.2	Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der Langerhanszellen	54
2.2.1	Vorversuche von Koch und Janke	54
2.2.2	IL-1 β wirkt in hoher Dosis in der Organkultur migrationsfördernd	56
2.2.3	Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1 α und IL-1 β in die Organkultur verhindert eine Migrationssteigerung	58
2.3	Kaskade	59
2.4	Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide wirken migrationsfördernd in der Organkultur:	62
2.5	Das Chemokin MIP-1 α kann die Emigration von Langerhanszellen steigern	65
2.6	Test diverser Interleukine auf ihren Einfluß in der Organkultur	67
3	Untersuchung der Reifung von Langerhanszellen	71
3.1	Einfluß von GM-CSF in der Organkultur	71
4	Ergebnisse zu den TNF α -, IL-1 β - und GM-CSF-Elisas	76
4.1	TNF α -Zusatz in die Organkultur	76
4.2	IL-1 β -Zusatz in der Organkultur	77
4.3	GM-CSF-Zusatz in die Organkultur	77
4.4	Lipopolysaccharide als Stimulator in der Organkultur	78
5	Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen	79
5.1	Nachweis von zwei DC-Markern (In-1, 2A1) auf LC und dermalen dendritischen Zellen <i>in situ</i> und <i>in vitro</i>	79
6	Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie	83
6.1	Untersuchung der Epidermis und Dermis	83
6.1.1	Kultur von Epidermis	83
6.1.2	Kultur von Ohrhaut	88
6.2	Untersuchung der aus der Epidermis und Dermis in 24 bzw. 48 Stunden emigrierten dendritischen Zellen und der in EC-Suspensionen gereiften Langerhanszellen	90
	D. Diskussion	94
1	Optimierung der Organkultur	94
1.1	Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation der Mäuseohren bei +4°C	94

1.2	Vorinkubation der Ohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium	95
2	Exogenes $\text{TNF}\alpha$ kann in der Organkultur die Migration von kutanen dendritischen Zellen wesentlich beeinflussen.....	97
2.1	Die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ ist dosisabhängig	97
2.2	Die Migrationshemmung bei hohen Dosen $\text{TNF}\alpha$ ist nicht auf die Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen	99
2.3	Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern kann die migrationsfördernde Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ aufgehoben werden.....	100
3	Exogenes IL-1 führt in der Organkultur zu einer Migrationssteigerung.....	101
3.1	IL-1 kann erst in hoher Dosis die Migration von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen	101
3.2	Neutralisierende Antikörper gegen IL-1 können die Migration von kutanen dendritischen Zellen hemmen	103
4	Gibt es eine Kaskade zwischen $\text{TNF}\alpha$ und IL-1	104
5	Bakterielle Bestandteile wie LPS können in der Organ-kultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern.....	107
6	Chemokine wie MIP-1 α haben Einfluß auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen.....	108
7	IL-4 und IL-10 haben keinen Einfluß in der Organkultur	109
8	GM-CSF erhöht die Zellviabilität und beschleunigt die Reifung der kutanen dendritischen Zellen.....	111
9	Mögliches Zusammenspiel der Zytokine der Haut.....	112
10	Untersuchung der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Rasterelektronenmikroskopie	113
11	Kritik an der Organkultur.....	115
E. Zusammenfassung.....		117
F. Anhang		119
G. Referenzen.....		121