

## **Universitäts- und Landesbibliothek Tirol**

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

**Stoitzner, Patrizia**

**1997**

A. Einleitung

# A. Einleitung

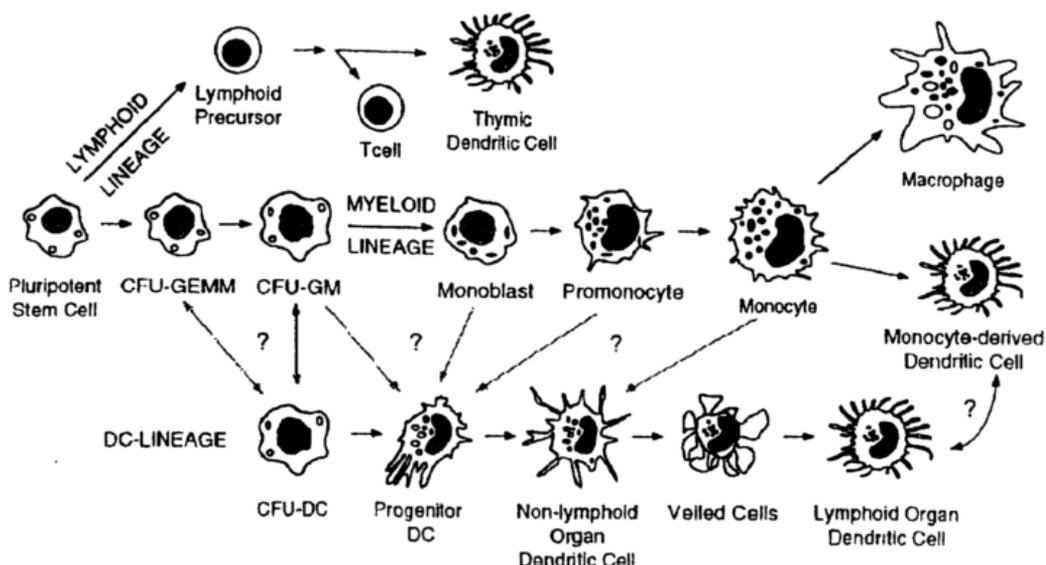
## 1 Das System der dendritischen Zellen:

### 1.1 Die Entdeckung:

Die dendritischen Zellen wurden erstmals 1974 von Steinman und Cohn an der Rockefeller University / New York in der Milz von Mäusen entdeckt (1). Anfangs wurden sie für spezialisierte Makrophagen gehalten und aufgrund ihres Aussehens als dendritische Zellen bezeichnet. Im Laufe der Jahre wurden sie als eigene Zelllinie anerkannt, da sie zwar von einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle abstammen, sich dann jedoch getrennt von den Makrophagen weiterentwickeln (2).

### 1.2 Herkunft und Vorkommen:

Dendritische Zellen sind CD45-positive Leukozyten und entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. In der myeloiden Reihe entwickeln sie sich neben den Phagozyten und Granulozyten, wobei die genauen Entwicklungsstadien noch nicht bekannt sind (Abb. 1).



**Abb. 1:** Mögliche Abstammung und die Entwicklungsstadien von dendritischen Zellen (3).

Dendritische Zellen sind in beinahe allen Geweben zu finden, wobei sie je nach Lokalisation unterschiedliche Phänotypen ausbilden und verschiedene Funktionen erfüllen.

## Übersicht über die Verteilung von dendritischen Zellen:

**Tab. 1:** Vorkommen der dendritischen Zellen im Gewebe

Kompartiment	Zellen	Lokalisation
nicht lymphatische Gewebe	Langerhanszellen dermale dendritische Zellen interstitielle dendritische Zellen	Epidermis, Schleimhäute Dermis Schleimhäute, Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm
Zirkulation	„veiled cells“ dendritische Zellen	afferente Lymphe peripheres Blut
lymphatische Gewebe	interdigitierende Zellen  marginale dendritische Zellen	T-Zell-Areale der sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Peyer'sche Plaques), Medulla des Thymus marginale Zone der Milz

### 1.3 Phänotyp der dendritischen Zellen:

Die aus dem Knochenmark stammenden Vorläufer der dendritischen Zellen wandern in verschiedene Gewebe und Organe. Diese „Gewebs-dendritischen Zellen“ werden als **unreife dendritische Zellen** bezeichnet, da sie noch einige Monozyten/Makrophagen-Marker exprimieren. Zu diesen zählen der Fc- (CD32) und der Komplement-Rezeptor (iC3b, CD11b) (4), F4/80-Makrophagenantigen, Membran-ATPasen, unspezifische Esterasen (5), endogene Peroxidase und der Rezeptor für Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden Faktor (M-CSF, CD115) (6). Ein weiteres Kennzeichen der dendritischen Zellen ist eine konstitutive Expression von MHC-Klasse II, die im Laufe der Reifung verstärkt wird (7). Als Beispiele für unreife dendritische Zellen in nicht lymphatischen Geweben sind die Langerhanszellen der Epidermis, die dermalen dendritischen Zellen der Dermis und die interstitiellen dendritischen Zellen in Herz, Lunge, Niere, Leber, Darm und Schleimhäuten zu nennen.

Auf bestimmte Stimuli, wie zum Beispiel Eindringen von Bakterien, Reizung durch Kontaktallergene etc., reagieren die unreifen dendritischen Zellen mit einer Wanderung via afferenter Lymphe in lymphatisches Gewebe. In dieser Phase werden sie als **veiled cells** bezeichnet, da sie im Zuge der Reifung lange, bewegliche, segelähnliche Zytoplasmfortsätze (*veils*) ausbilden.

Im Laufe dieser Migration entwickeln sie sich zu **reifen dendritischen Zellen**.

Nach dem Erreichen der sekundären lymphatischen Organe, wie zum Beispiel der Lymphknoten, werden sie auch als „lymphoide dendritische Zellen“ bezeichnet. Die phänotypischen Veränderungen während der Reifung beruhen auf einer verstärkten Expression von MHC-Klasse II und einer erhöhten bzw. einer *de novo* Expression von Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel CD11c, ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58), CD44v9. Weiters werden zur T-Zell-Aktivierung benötigte costimulatorische Moleküle, wie B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), vermehrt exprimiert. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion bzw. zu einem Verlust der vorher erwähnten Monozyten/Makrophagen-Marker (7, 8, 9).

**Tab. 2:** Der Phänotyp von residenten und kultivierten murinen Langerhanszellen (LC) im Vergleich zu lymphoiden dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen (7)

Marker	residente LC	kultivierte LC	Milz DC	Thymus DC	Makrophagen
Birbeck-Granula	+	-	-	-	-
Phagozytose	+	-	-	-	+++
MHC-Klasse I	+	++	++	++	+
MHC-Klasse II	++	+++	++	+++	±
F4/80	+	±	-	-	++
C3bi/CD11b	+	+	+	+	++
FcRII/CD32	+	±	-	±	++
NLDC-145 <sup>1</sup>	+	+	-	+	-
33D1 <sup>2</sup>	-	-	+	-	-
J11D <sup>3</sup>	+	+	-	+	-
IL-2 Rezeptor	-	+	±	+	-
ATPase	+	-	-	n.g.	+
nichtspezifische Esterase	+	-	-	n.g.	+
endogene Peroxidase	+	n.g.	-	n.g.	+
S-100	+	+	+	+	-

**Legende:** <sup>1</sup> ... Marker für interdigitierende Zellen in den Lymphknoten, Lektin-ähnlicher Rezeptor DEC-205 (10)

<sup>2</sup> ... klassischer DC-Marker in der Maus

<sup>3</sup> ... B-Zell-Marker, hitze-stabiles Antigen

+ ... vorhanden, ++/+++ ... mäßige/starke Zunahme, - ... nicht vorhanden

n.g. ... nicht getestet

## **1.4 Funktionen der dendritischen Zellen:**

Die Aufgaben und Fähigkeiten der dendritischen Zellen sind vielfältig. Sie sind die wichtigsten Induktoren der Immunabwehr, da sie als einziger Zelltyp in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren. Die drei verschiedenen Funktionsbereiche von dendritischen Zellen sind räumlich wie auch zeitlich getrennt (11):

### **1.4.1 Wächterfunktion:**

Die unreifen dendritischen Zellen in den nicht lymphatischen Geweben sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Endozytose dazu geeignet, fremde Antigene aufzunehmen und zu verarbeiten. Durch Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Aufnahme (12) können Moleküle, durch Phagozytose ganze Mikroorganismen (13) von den Zellen aufgenommen werden. In spezialisierten Organellen (endosomales-lysosomales System) findet die Zerlegung der Proteine in Peptide statt. Die prozessierten Peptide werden nach Koppelung an MHC-Moleküle an die Zelloberfläche weitergeleitet und dort T-Lymphozyten präsentiert.

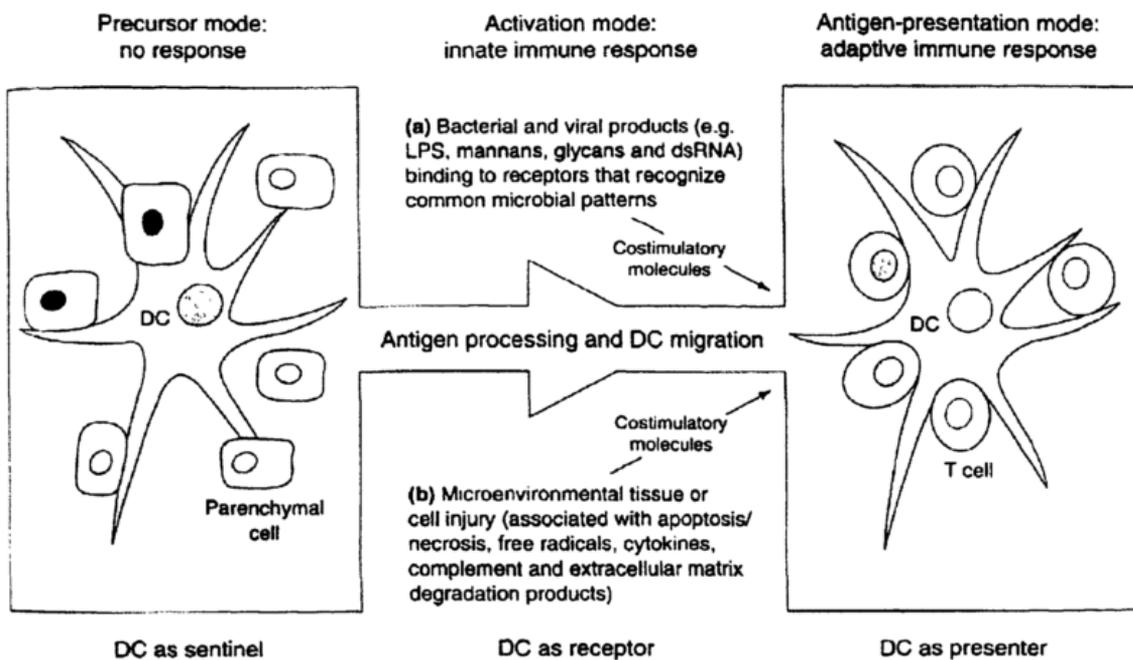
### **1.4.2 Migratorische Funktion:**

Um die MHC-Peptidkomplexe effektiv den T-Zellen präsentieren zu können, müssen die dendritischen Zellen an Orte wandern, an denen T-Zellen zahlreicher vorkommen als in den nicht lymphatischen Geweben. Dazu müssen sie von den Grenzflächen über die afferente Lymphe in die lymphatischen Organe emigrieren. Die für die Wanderung benötigten Adhäsionsmoleküle werden *de novo* oder verstärkt exprimiert und helfen den Zellen, an den Ort der Antigenpräsentation zu gelangen. Während der Wanderung verlieren sie die Fähigkeit, Antigene zu prozessieren, steigern jedoch ihre Antigenpräsentations- und T-Zell-Stimulationsfähigkeit durch Expression von costimulatorischen Molekülen (CD80, CD86).

### **1.4.3 Adjuvansfunktion:**

Die dendritischen Zellen werden als Adjuvans der Natur (11,14) bezeichnet, da sie in der Lage sind, eine starke primäre Immunantwort auszulösen. In den T-Zell-Arealen von Milz und Lymphknoten ist die Wahrscheinlichkeit, einen passenden T-Zell-Klon

zu finden, am größten. In einer antigen-unabhängigen Weise nehmen die dendritischen Zellen über Adhäsine Kontakt zu den T-Zellen auf und gehen eine dauerhafte Bindung ein, wenn sie den passenden T-Zell-Rezeptor vorfinden (15,16). Dabei spielen wiederum die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LAF-3 und die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 eine wichtige Rolle. In den DC-T-Zell-Clustern kommt es zur T-Zell-Proliferation und zur Bildung von Zytokinen, welche die Immunantwort durch Aktivierung weiterer Zellen verstärken.



**Abb. 2:** Lebenslauf einer dendritischen Zelle (17)

## 2 Die Haut als Immunorgan (*skin-associated lymphoid tissue, SALT* (18)):

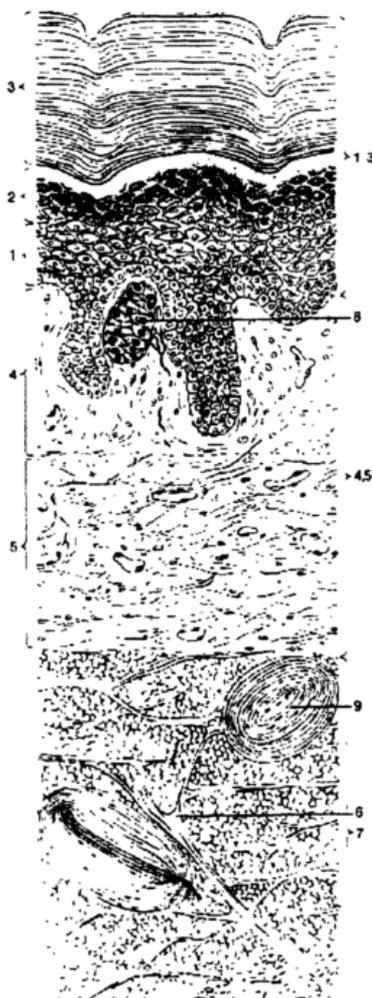
### 2.1 Aufbau der Haut:

Die Haut als Grenzfläche zur Umgebung hat vielfältige Aufgaben. Neben der Barrieren-Funktion gegen mechanische, chemische und thermische Noxen und gegen das Eindringen von Krankheitserregern dient sie der Temperaturregulierung, spielt eine Rolle bei der Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, fungiert als Sinnes- und Kommunikationsorgan und übernimmt nicht zuletzt sehr wichtige Aufgaben des Immunsystems.

Die **Oberhaut (Epidermis)** besteht aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel, das aus Keratinozyten aufgebaut ist. In den basalen Schichten zwischen den Epithelzellen befinden sich Melanozyten, die durch Pigmentbildung vor schädlichen UV-Strahlen schützen, Merkelsche Tastscheiben zur Sinneswahrnehmung und die Langerhanszellen, die eine Art Wächterfunktion im Rahmen der Immunabwehr einnehmen.

Die **Lederhaut (Dermis)** besteht aus einem dichten Kollagenfasergeflecht, in welches Blut- und Lymphgefäße, Nerven aufzweigungen und Nervenendkörperchen, Bindegewebszellen, Hautdrüsen und Haarwurzeln, sowie verschiedenste Immunzellen, wie dermale dendritische Zellen, Lymphozyten und Makrophagen, eingelagert sind.

Zwischen diesen zwei Hautschichten liegt die **Basalmembran**, über die Epidermis und Dermis durch Bindegewebspapillen und Zytoplasmfortsätze miteinander verbunden sind (epidermal-dermale Junctionszone).



**Abb. 3:** Aufbau der Haut, histologische Übersicht (19)

- 1 – 5 Cutis = Epidermis und Dermis
- 1 – 3 Epidermis
- 1 Regenerationsschicht
- 2 Hornbildungsschicht
- 3 Hornschicht
- 4, 5 Dermis
- 4 Papillarschicht
- 5 Geflechschicht
- 6 Retinacula cutis
- 7 Tela subcutanea
- 8 Meissnersches Tastkörperchen
- 9 Vater-Pacinisches Lamellenkörperchen

## 2.2 Die dendritischen Zellen der Haut:

Die kutanen dendritischen Zellen werden in zwei Zelltypen unterteilt:

Die **dermalen dendritischen Zellen** sind *in situ* nicht eindeutig definiert. In der Zellkultur nach Auswanderung aus dem Gewebe besitzen sie den gleichen Phänotyp wie reife dendritische Zellen, zum Beispiel hohe MHC-Klasse II-Expression, Fehlen der Monozyten/Makrophagen-, Lymphozyten- und Endothelzell-Marker, Expression von Adhäsions- und costimulatorischen Molekülen (CD11/CD18, CD54, CD80, CD86, CD40) und starke T-Zell-Stimulationsfähigkeit (20).

Die **Langerhanszellen** der Epidermis ähneln unreifen dendritischen Zellen aufgrund des Vorhandenseins von MHC-Molekülen in geringen Mengen, von Monozyten/Makrophagen-Markern, NLDC-145 (21) und der für sie typischen Birbeck-Granula, deren Funktion nach wie vor nicht geklärt ist (4,7). Langerhanszellen werden als spezialisierte unreife dendritische Zellen angesehen, die aus dem Knochenmark stammend (2) in der Epidermis Antigen aufnehmen und prozessieren können (22). Nach Antigenaufnahme und durch diverse inflammatorische Zytokine stimuliert, beginnen sie, über die afferente Lymphe in die Lymphknoten zu wandern (23), um dort effektiv T-Zellen zu stimulieren und eine primäre Immunantwort auszulösen. Dieses Modell der Langerhanszell-Reifung und -Wanderung wird durch *in vitro*-Experimente gestützt, die zeigten, daß frisch isolierte Langerhanszellen sehr gut Antigene prozessieren können. Nach Kultivierung sind die reifen Langerhanszellen in der Lage, prozessierte Proteine effektiv T-Lymphozyten zu präsentieren (24).

Eine weiterer Zelltyp, der in der Dermis vorkommt und für die Immunfunktion der Haut wichtig ist, sind die Vorläufer der kutanen dendritischen Zellen. Sie stammen aus dem Knochenmark und wandern vermutlich über die Dermis in die Epidermis ein, um dort durch Emigration der Langerhanszellen entstandene Lücken wieder aufzufüllen.

## 2.3 Zytokinproduktion in der Haut:

Zytokine sind Immunbotenstoffe, die von verschiedensten Zellen gebildet werden. Sie vermitteln und regulieren in einem sehr komplexen Wechselspiel die Immunantwort sowohl im Rahmen der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr. Sie werden als Reaktion auf Kontakt mit bakteriellen

(Lipopolysaccharide) und viralen Bestandteilen, Kontaktallergenen oder Parasiten von Immunzellen *de novo* gebildet und rasch sezerniert. In einer Kaskade können sie die Produktion anderer Zytokine beeinflussen und mit diesen synergistisch oder antagonistisch wirken. Die Wirkung beruht auf einer Bindung an spezifische Rezeptoren, wobei sie autokrin auf die gleiche Zelle, parakrin auf die Nachbarzellen und endokrin auf entfernt liegende Zellen wirken können. Durch die Zytokin-Rezeptor-Bindung werden in der Zielzelle verschiedenste Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren in Gang gesetzt, die zu einer verstärkten Proliferation, Zytokin- oder Antikörperfreisetzung führen.

Die Epidermis ist hinsichtlich ihres Zytokinmusters besser untersucht als die Dermis, da sie weniger verschiedene Zelltypen enthält. Keratinozyten und Langerhanszellen sind die Hauptquellen für Zytokine, wobei aber auch Melanozyten und epidermale dendritische T-Zellen Zytokine sezernieren können. Die Dermis enthält viel mehr Immunzellen (dermale dendritische Zellen, Lymphozyten, Makrophagen etc.), die Zytokine freisetzen können, die unter anderem in die Epidermis diffundieren können. Daher wird in dieser Arbeit hauptsächlich auf die Zytokininduktion und -produktion in der Epidermis eingegangen.

### **2.3.1 Zytokinproduktion der Keratinozyten:**

Zur Untersuchung des Zytokinvorkommens *in situ* werden Keratinozyten isoliert und ihre mRNA-Expression gemessen. Durch Vergleich mit dem mRNA-Muster nach Kultivierung der Zellen konnte festgestellt werden, daß Zytokine im Laufe der Kultur vermehrt freigesetzt werden (25). Es konnten die mRNA's für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden, wobei nur IL-1 $\alpha$  in biologisch aktiver Form von Keratinozyten sezerniert werden kann (26). Weiters konnte die Produktion von GM-CSF, M-CSF (27), TNF $\alpha$  (28, 29) und diverser anderer Interleukine, wie zum Beispiel IL-6 (30), IL-10 (31) gemessen werden. In Tab. 3 ist die mRNA-Expression der Keratinozyten im Vergleich zu Langerhanszellen dargestellt.

### **2.3.2 Zytokinproduktion in Langerhanszellen:**

Auch hier unterscheidet sich das Zytokinmuster der frisch isolierten und der kultivierten Zellen. Im wesentlichen waren mRNA's für IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$  und MIP-2

nachweisbar, wobei die IL-1 $\beta$ -Produktion in der Kultur erhöht wurde (25, 28, 32). Nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Phorbol Myristat Azetat (PMA) konnte auch in Langerhanszellen eine TNF $\alpha$ -Produktion festgestellt werden (33) (Tab. 3).

**Tab. 3:** Zytokin-mRNA-Expression von Langerhanszellen und Keratinozyten *in situ* oder in Kultur

Zytokine	frisch isolierte Langerhanszellen	kultivierte Langerhanszellen	frisch isolierte Keratinozyten	kultivierte Keratinozyten
IL-1 $\alpha$	-	-	+	++
IL-1 $\beta$	+	++	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
GM-CSF	-	-	+	++
TNF $\alpha$	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	+	++
IL-6	-	+	+	+
IL-10	-	-	+	+
MIP-1 $\alpha$	++	+	-	-
MIP-2	++	+	+	+

Legende: Langerhanszellen und Keratinozyten über 72 h kultiviert;

-... nicht nachgewiesen

+ ... nachgewiesen

++ ... Zunahme

<sup>1</sup> ... nicht in biologisch aktiver Form nachgewiesen

<sup>2</sup> ... nur nach Stimulierung mit LPS oder PMA nachgewiesen

## 2.4 Beeinflussung der Wanderung kutaner dendritischer Zellen durch in der Haut gebildete Zytokine:

Die Zytokine, die in der Epidermis und Dermis gebildet werden, beeinflussen die Emigration der kutanen dendritischen Zellen aus der Haut in die Lymphknoten. In komplexen synergistischen und/oder antagonistischen Wechselwirkungen kann die Wanderung und die Reifung der Zellen induziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der oben genannten Zytokine auf ihren Einfluß auf die Wanderung kutaner dendritischer Zellen mit Hilfe der Organkultur untersucht.

TNF $\alpha$ , das vor allem von sensibilisierten Keratinozyten, aber auch unter bestimmten Bedingungen von Langerhanszellen gebildet wird, gilt als einer der wichtigsten Induktoren zur Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis (34). Zusätzlich kann TNF $\alpha$  die Zellviabilität steigern bzw. erhalten (35).

In engem Zusammenspiel mit diesem inflammatorischen Zytokin wird **IL-1 $\beta$** , das von Langerhanszellen gebildet wird, als zusätzlicher Induktor betrachtet (36). Inwieweit diese zwei Zytokine in einer Kaskade wirken, ist Gegenstand der laufenden Forschungsarbeit. Das eng verwandte **IL-1 $\alpha$**  wird von Keratinozyten gebildet und kann die Funktion von IL-1 $\beta$  ersetzen (36), wobei der genaue Wirkungsmechanismus und die biologische Funktion dieses Zytokins nicht geklärt sind. Sehr wahrscheinlich spielt es durch Erhöhung der T-Zell-Stimulationsfähigkeit von dendritischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion der primären Immunantwort (37).

Das von Langerhanszellen sezernierte Chemokin **MIP-1 $\alpha$** , das durch IL-1 $\beta$  und LPS induziert wird (38), spielt eine wichtige Rolle bei viralen Infektionen (39) und kann eine gerichtete Migration von dendritischen Zellen auslösen (40). Eine weitere mögliche Funktion ist die Rekrutierung von Vorläufern der Langerhanszellen in die Haut ; dies ist für MCP-1, ein ähnliches Chemokin, beschrieben worden (41).

**IL-10** gilt als tolerogenes Zytokin für dendritische Zellen, da es einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung und Reifung von Langerhanszellen und dendritischen Zellen aufweist (42). Es kann in mononukleären Zellen die Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MIP-1 $\alpha$  inhibieren (43, 44). Als Antagonist zu TNF $\alpha$  und IL-1 spielt es bei der Induktion einer Immunantwort in der Haut eine wichtige Rolle, da es deren Entstehung inhibieren kann.

**GM-CSF** kann in Kulturen mit Blut- oder Knochenmark-Vorläufern eine Reifung der dendritischen Zellen induzieren und die Zellviabilität erhöhen (45, 46), aber der genaue Einfluß auf die Migration kutaner dendritischer Zellen ist noch nicht bekannt.

### **3 Zielsetzung der Diplomarbeit:**

Die Methode der Wahl in dieser Arbeit war die Kultivierung von muriner Haut nach dem Modell von Larsen et al. (9). Die Organkultur war weiter modifiziert worden und erwies sich als geeignet für die Untersuchung der Emigration von kutanen dendritischen Zellen und deren Induktoren (47, 48, 49). Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Zytokinen und Antikörpern in das Medium, auf dem die Hautproben aufschwimmen, können dosisabhängige migrationssteigernde und inhibitorische Effekte durch Veränderungen der Zahl an emigrierenden Zellen im Medium bestimmt werden. Bei vorheriger Trennung der Epidermis und Dermis könnte das Migrationsverhalten von Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen getrennt untersucht werden, was aber aufwendiger und kostenintensiver wäre. Daher wurde die Organkultur mit kompletter muriner Haut durchgeführt und die Wanderung beider Zelltypen beobachtet. Durch ihr ähnliches Aussehen ist eine Unterscheidung der epidermalen und der dermalen Zellen im Lichtmikroskop hierbei nicht möglich.

#### **3.1 Optimierung der Organkultur:**

Zu Beginn wurden Versuche zur Optimierung der Organkultur durchgeführt. Der hohe Verbrauch an Zytokinen und Antikörpern und die teilweise unvollständige Wirkung der Reagenzien sollten vermieden werden.

##### **Fragestellungen:**

1. Kann durch Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation bei +4°C eine bessere und gezieltere Wirkung der Zytokine und Antikörper erreicht werden?
2. Führt die Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium zur verbesserten Diffusion der Zytokine und Antikörper zwischen den verhornten Keratinozyten in die Epidermis?

### **3.2 Einfluß der inflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen:**

Die zwei in der Epidermis gebildeten Zytokine können die Zahl der Langerhanszellen in der Haut verringern. In den Lymphknoten waren Anhäufungen von dendritischen Zellen zu beobachten, was auf eine gerichtete Wanderung in lymphatisches Gewebe hindeutet (34, 36, 50). Auf der Grundlage der Vorarbeiten von Ortner und Zanella (47, 48) war eine gezielte Untersuchung der Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  auf die Migration möglich.

#### **Fragestellungen:**

1. Ist die  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung dosisabhängig?
2. Wirken hohe Dosen von  $\text{TNF}\alpha$  toxisch auf die kutanen dendritischen Zellen?
3. Können Antikörper gegen  $\text{TNF}\alpha$  die migrationsfördernde Wirkung aufheben und die Wanderung im reinen Kulturmedium beeinflussen, d.h. wirkt in den Kulturen endogener  $\text{TNF}\alpha$ ?
4. Kann  $\text{IL-1}\beta$  in hoher Dosis die Migration steigern?
5. Können die Antikörper gegen  $\text{IL-1}\beta$  die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  und die Wanderung im reinen Medium verändern, d.h. wirkt in den Kulturen endogenes  $\text{IL-1}\beta$ ?
6. Gibt es eine Kaskade zwischen  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , d.h. induziert ein Zytokin das andere?
7. Können mit Hilfe von Elisa die Konzentrationen an endogenem  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  bestimmt werden?

### **3.3 Lipopolysaccharide als Induktoren der Wanderung:**

Die im Rahmen der Immunabwehr von gram-negativen Bakterien aus der Zellwand freigesetzten Lipopolysaccharide (LPS) wirken als Endotoxine. Sie führen durch Induktion von Zytokinen, in der Epidermis hauptsächlich von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\alpha$ , zu einer Stimulation der Emigration von Langerhanszellen (50).

### **Fragestellungen:**

1. Führt eine Zugabe von LPS ins Medium zu einer Steigerung der Migrationsrate?
2. Ist die LPS-Wirkung dosisabhängig?
3. Wird die LPS-Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  vermittelt?
4. Können durch LPS induzierte Zytokine, wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , mit Elisa nachgewiesen werden?

### **3.4 Die Rolle von MIP-1 $\alpha$ bei der Migration:**

In der Epidermis werden neben inflammatorischen Zytokinen auch Chemokine, die auf Zellen chemotaktisch wirken und ihre Wanderung induzieren können, von Langerhanszellen produziert. Die durch die Auswanderung von Langerhanszellen entstandenen Lücken in der Epidermis müssen durch nachkommende Vorläufer aus dem Knochenmark wieder aufgefüllt werden. Bei einer Migrationsauslösung durch Antigenkontakt können die Langerhanszellen zusätzlich zu den inflammatorischen Zytokinen Chemokine freisetzen, die eine Rekrutierung von Vorläuferzellen in die Haut bewirken (41). Weiters kann MIP-1 $\alpha$  die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  induzieren (51).

### **Fragestellungen:**

1. Kann MIP-1 $\alpha$  die Migration steigern?
2. Ist die Wirkung dosisabhängig?
3. Führt eine Zugabe von anti- $\text{TNF}\alpha$  und anti-IL-1 $\beta$  zu einer Beeinflussung der MIP-1 $\alpha$ -Wirkung?

### **3.5 IL-10 und IL-4 als inhibitorische Zytokine für kutane dendritische Zellen:**

IL-10 und IL-4 haben eine inhibitorische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, Langerhanszellen und dendritische Zellen. Beide Zytokine können die Synthese von zahlreichen anderen Zytokinen verhindern (52). Der inhibitorische Effekt von IL-4 ist nicht ganz so offensichtlich und gut untersucht wie bei IL-10. Im Gegenteil, IL-4 wird mittlerweile zusammen mit GM-CSF dazu verwendet, Monozyten aus peripherem humanen Blut in Kultur zur Entwicklung in dendritische Zellen zu stimulieren (45).

### **Fragestellungen:**

1. Führt eine Zugabe von anti-IL-10 in die Organkultur durch Abblocken des endogenen IL-10 zu einer Steigerung der Migrationsrate?
2. Hat IL-4 Einfluß auf die Wanderung durch Stimulation von Monozyten-Vorläufern in der Dermis zur Entwicklung in Langerhanszellen?

### **3.6 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur:**

Das von Keratinozyten produzierte GM-CSF kann die Reifung und Zellviabilität von Langerhanszellen fördern (37). Den gleichen Effekt hat es in Kulturen mit Blut-Monozyten zur Generierung von dendritischen Zellen (45) und in Kulturen von murinen Knochenmarksvorläufern dendritischer Zellen (53). Ein möglicher Einfluß auf die Wanderung dieser Zellen ist noch nicht genau untersucht, aber es scheint durch Hochregulierung des GM-CSF-Rezeptors durch  $TNF\alpha$  und IL-1 zu einer gesteigerten Reifung der Zellen und somit zu einer Induktion der Emigration zu kommen.

### **Fragestellungen:**

1. Kann GM-CSF die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur beeinflussen?
2. Ist endogenes GM-CSF in den Kulturüberständen mit Elisa meßbar?

### **3.7 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen und der Haut nach der Organkultur:**

Ergänzend zu den Studien über die Emigration der kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur wurden die Hautproben vor und nach der Kultur mit Immunfluoreszenz-Färbungen und Rasterelektroenenmikroskopie untersucht.

### 3.7.1 Immunfluoreszenz:

#### Fragestellungen:

1. Sind Unterschiede in der Langerhanszellendichte in der Epidermis vor und nach der Kultur zu erkennen?
2. Kann man *cords* in der Dermis sehen?
3. Sind die dendritischen Zellmarker In-1 und 2A-1 auf den Zellen *in situ* und *in vitro* nachweisbar?

### 3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie:

#### Fragestellungen:

1. Sind emigrierende Langerhanszellen an der Epidermisunterseite zu beobachten?
2. Wie sieht die Dermisunterseite aus?
3. Kann man einen Unterschied zwischen den in 24 und 48 Stunden und den aus der Epidermis und der Dermis getrennt ausgewanderten Zellen sehen?
4. Unterscheiden sich die in epidermalen Zellsuspensionen gereiften Langerhanszellen von den aus der Epidermis ausgewanderten Zellen?