

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

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

Stoitzner, Patrizia

1997

C. Ergebnisse

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

C. Ergebnisse

Die Methode der Organkultur von Haut, mit der sich die Emigration von Langerhanszellen untersuchen läßt, wurde von Larsen et al. (9) etabliert. Im Laufe der letzten Jahre wurde diese Methode im Gewebekulturlabor der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie von mehreren Diplomanden und Dissertanten weiter modifiziert (47, 48). Auf dieser Basis und mit Hilfe der ersten mit dieser Methode erhaltenen Daten, die auf einen großen Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die Wanderung der Langerhanszellen hindeuten, konnten in der vorliegenden Arbeit gezielt weitere Versuche mit diesen Zytokinen, diversen anderen Stimulantien der Migration sowie Antikörpern durchgeführt werden.

1 Optimierung der Organkultur:

Eines der großen Probleme der Organkultur war und ist das langsame und wahrscheinlich unvollständige Eindringen der Zytokine und Antikörper in das Gewebe. Das führt zu einem hohen Verbrauch an diesen Substanzen und, besonders bei Zugabe von neutralisierenden Antikörpern, zur Unsicherheit, ob diese Reagenzien in ausreichender Menge an den Wirkungsort gelangen. Deshalb wurden in früheren Experimenten die Antikörper den Mäusen vor der Tötung und dem Abschneiden der Ohren systemisch verabreicht (intradermal oder intraperitoneal). Dabei handelte es sich um Tierversuche im Sinne des Gesetzes. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen, wurden zu Beginn der Arbeit mehrere Versuche zur Optimierung der Organkultur durchgeführt.

1.1 Änderung der Bedingungen während der Vorinkubation:

1. Versuchsansatz:

Die erste Idee bestand darin, die Zytokine und Antikörper bereits während einer Vorinkubation von 26-28 Stunden im Kühlschrank, während der die endogene Zytokinproduktion eingestellt wird, auf die Ohren einwirken zu lassen. Dazu wurden die dorsalen Ohrhälften nach Desinfektion mit Ethanol auf Medium (R10-HEPES zur Stabilisierung des pH-Wertes) mit $\text{TNF}\alpha$, anti- $\text{TNF}\alpha$ (V1q, supernatant (54)) und

anti-IL-1 β in 24-well-Platten aufgelegt und in den Kühlschrank gestellt. Nach der Vorinkubation wurden die Platten in den Brutschrank transferiert und für weitere 48 Stunden im gleichen Medium inkubiert.

Tab. 5: Verringerte Auswanderungsrate von dendritischen Zellen (DC) nach Vorinkubation und 48-stündiger Organkultur auf R10-HEPES mit Zusätzen

Medium während der 28h Vorinkubation	Medium während der 48h Kultur	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
-	R10	28180	14100	100%
-	R10 + V1q (200 µl/well)	35310	11550	82%
-	R10 + anti-IL-1 β	20310	8900	63%
-	R10 + TNF α 50 U/ml	34260	20600	146%
-	R10 + TNF α 100 U/ml	25360	13600	97%
-	R10 + TNF α 1000 U/ml	19330	7800	55%
-	R10 + TNF α 5000 U/ml	10970	5020	36%
R10-HEPES	R10-HEPES	18530	8080	100%
R10-HEPES + V1q (500 µl/well)	R10-HEPES + V1q (500 µl/well)	15410	4750	58%
R10-HEPES + TNF α 100 U/ml*	R10-HEPES + TNF α 100 U/ml*	21820	9080	112%
R10-HEPES + V1q (500 µl/well)+ TNF α 1000 U/ml*	R10-HEPES + V1q (500 µl/well)+ TNF α 1000 U/ml*	20660	9500	117%
R10-HEPES + anti-IL-1 β	R10-HEPES + anti-IL-1 β	25190	9900	122%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation für 28h/+4°C: Ohren auf einem feuchten Tupfer bei den Kontrollen (R10 mit Zusätzen) bzw. auf R10-HEPES mit Antikörper- und Zytokin-Zugabe; Inkubation für 48h/ 37°C: R10–Ansätze auf frischem Medium, R10-HEPES-Ansätze auf dem gleichem Medium wie während der Vorinkubation, *...TNF α -Zugabe erst nach der Abliegezeit, anti-IL-1 β : 10 µg/ml; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in den reinen Kulturmedien ohne Zusätze ist jeweils als 100% angegeben.

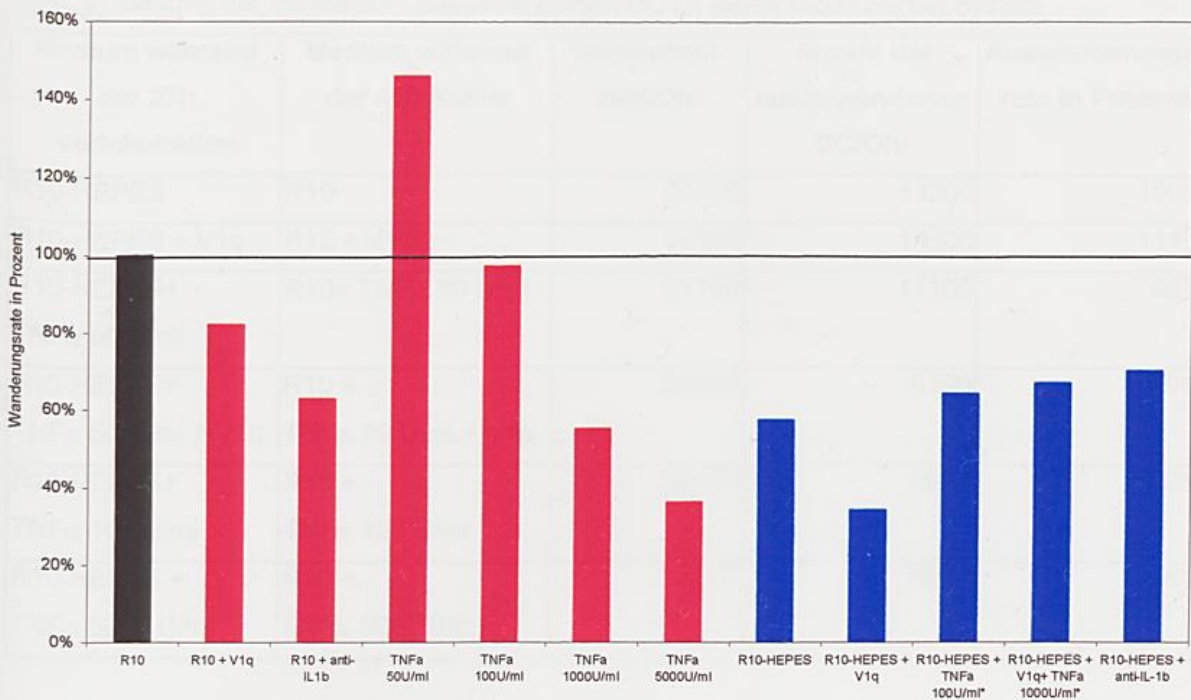


Abb. 4: Darstellung der Auswanderungsrate von kutanen dendritischen Zellen im modifizierten System, R10 ohne Zusätze und R10 mit Antikörpern und Zytokinen als Kontrollen verwendet zum Vergleich der Wirksamkeit der Vorinkubation auf R10-HEPES (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 5)

Die Zählung der dendritischen Zellen im modifizierten System (Tab. 5, Abb. 4) erwies sich als äußerst schwierig, da die Zellen kein typisch dendritisches Aussehen aufwiesen. Zusätzlich hatten sie eine eckigere Form als die Kontrollzellen aus dem R10-Medium. Daraus konnte man den Schluß ziehen, daß die Zellen im R10-HEPES keine idealen Bedingungen vorfanden und daher sowohl die Wanderung als auch die Reifung der kutanen dendritischen Zellen beeinträchtigt war. Die Zellviabilität lag bei 78-80%, war also nicht erniedrigt.

2. Versuchsansatz:

Nach diesem ersten Ergebnis wurde das System nochmals abgewandelt. Die Mäuseohren wurden nach der Vorinkubation im Kühlschrank auf R10-HEPES mit Zytokin- und Antikörper-Zusätzen nicht im gleichen Medium belassen, sondern auf ein **frisches** R10-Medium ohne HEPES mit den jeweils gleichen Zusätzen aufgelegt und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Tab. 6: Zählung der ins Medium ausgewanderten DC im weiter modifizierten System

Medium während der 27h Vorinkubation	Medium während der 48h Kultur	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
R10-HEPES	R10	24600	13200	100%
R10-HEPES + V1q	R10 + V1q	27560	14600	111%
R10-HEPES+ TNF α 50 U/ml	R10+ TNF α 50 U/ml	21180	11100	84%
R10-HEPES+ TNF α 50 U/ml + V1q	R10 + TNF α 50 U/ml + V1q	20900	9100	69%
R10-HEPES+ TNF α 100 U/ml	R10 + TNF α 100 U/ml	24400	8900	67%
R10-HEPES + TNF α 5000 U/ml	R10 + TNF α 5000 U/ml	14670	5800	44%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation auf R10-HEPES mit Zusätzen 27h/+4°C; Inkubation der Organkultur auf R10 mit Zusätzen für 48h/ 37°C, V1q: 500 μ l/well; ein- bis zweimalige Zählung der Zellen in 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in R10-HEPES/R10 wird mit 100% als Kontrolle verwendet.

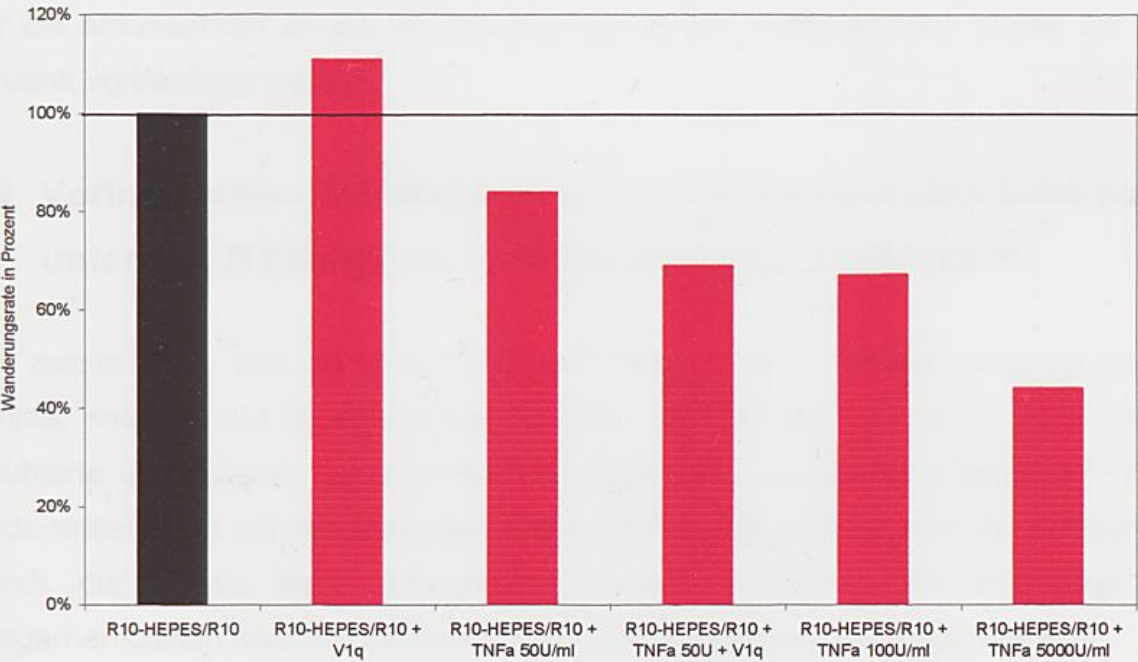


Abb. 5: Die Vorinkubation der Ohren auf R10-HEPES führte wieder zu einer Erniedrigung der Zellzahl (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 6).

Die Zellzahlen sind in diesem Versuch auf dem Niveau der Kontrolle bzw. verringert (Tab. 6 und Abb. 5). Auch bei diesem Ansatz hatte nur ein Teil der Zellen ein typisch dendritisches Aussehen und die eckige Form einiger Zellen deutete daraufhin, daß

die Vorinkubation der Mäuseohren auf R10-HEPES wieder einen negativen Einfluß auf die Wanderung und Reifung der kutanen dendritischen Zellen hatte. Die Zellviabilität war wieder im Bereich von 71-87%, was auf eine normale Absterberate der Zellen hindeutete.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß sich die Vorinkubation der Mäuseohren im Kühlschrank auf R10-HEPES zur verbesserten Wirkung der Antikörper und Zytokine als ineffektiv erwies. Bei dieser Modifikation der Organkultur kam es zu einer allgemeinen Erniedrigung der Zellzahlen, was auf einen negativen Einfluß der Bestandteile im R10-HEPES bzw. der Methode der Vorinkubation schließen läßt. Die kutanen dendritischen Zellen waren eindeutig in ihrer Wanderung und Reifung behindert, was zu einer Deformation der Zellen und dem Fehlen der typischen *veils* führte. Die Erhöhung der Zellzahl im Falle von niedrigen Dosen $TNF\alpha$ bzw. eine deutliche Verringerung der Zellzahl im Falle von Antikörper-Zugabe (ersichtlich aus Tab. 5, 6 und Abb. 4, 5) war nicht zu beobachten. Da die Daten zahlreicher Vorexperimente mit diesem modifizierten System nicht reproduziert werden konnten, wurde für alle weiteren Versuche die ursprüngliche Methode (siehe B 3.1) verwendet, bei der die Mäuseohren 26 bis 28 Stunden auf einem PBS-feuchten Tupfer im Kühlschrank vorinkubiert werden.

1.2 Vorinkubation der Mäuseohren mit der epidermalen Seite nach unten auf R10-Medium mit Zytokinen und Antikörpern:

Die zweite Idee, wie die Wirkung der Zytokine und Antikörper verstärkt werden könnte, entstand auf Grundlage der Arbeiten von Rambukkana (61). Diese Gruppe inkubierte explantierte humane Haut vor Applikation von Kontaktallergenen mit der epidermalen statt mit der dermalen Seite nach unten auf Medium mit Antikörpern. Durch die in die Haut diffundierten Antikörper konnte die Emigration von Langerhanszellen nach Applikation eines Kontaktallergens verhindert werden.

Im folgenden Ansatz wurden die Ohren nach 26,5-stündiger Abliegezeit auf einem PBS-feuchten Tupfer mit der epidermalen Seite nach unten auf das Medium aufgelegt. Zusammen mit den Zytokinen und Antikörpern wurden sie eine Stunde lang im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend wurden die Ohren umgedreht, sodaß sie wie üblich mit der dermalen Seite nach unten auf dem Medium aufschwammen.

Tab. 7: Wanderungsrate der dendritischen Zellen im zweiten Optimierungsversuch

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC / Ohr	Auswanderungsrate in Prozent
keine	34300	11640	100%
TNF α 50 U/ml	28050	11270	97%
TNF α 50 U/ml + V1q (500 μ l/well)	47000*	7500	64%
TNF α 5000 U/ml	8650	2900	25%
keine; v	10330	2500	100%
TNF α 50 U/ml; v	12250	3030	121%
TNF α 50 U/ml + V1q (500 μ l/well); v	5010	1040	41%
TNF α 50 U/ml + V1q (100 μ l/well); v	5600	1200	48%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 26,5h/+4°C, v = verkehrt aufgelegte Ohren, Vorinkubation mit epidermaler Seite nach unten: 1h/ 37°C; Inkubationszeit mit dermalen Seite nach unten: 48h/ 37°C; Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer zweimal, Zellzahlen sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate in den reinen Kulturmedien ohne Zusätze ist jeweils als 100% angegeben.

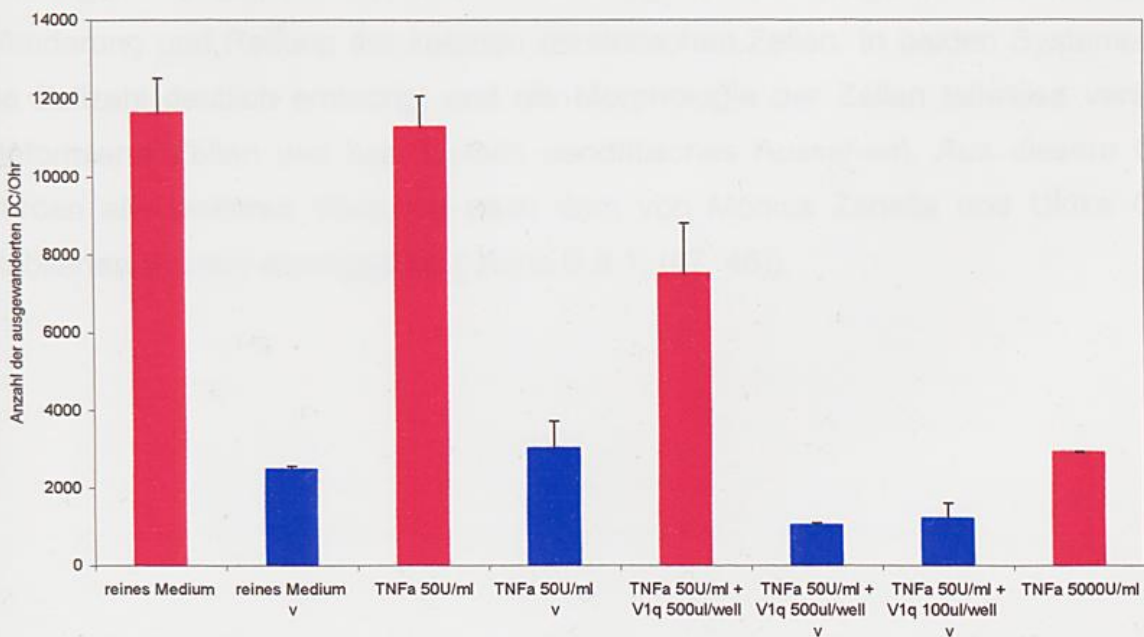


Abb. 6: Die Organkultur, bei der die Ohren mit der epidermalen Seite nach unten vorinkubiert wurden, zeigte keine verbesserte Wirkung der Zytokine und Antikörper (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 7). v...Ohren verkehrt aufgelegt

Bei der zweiten Modifikation des Organkulturmodells war eine deutliche Steigerung der Wanderungsrate durch $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml und eine Hemmung der Wanderung durch anti- $\text{TNF}\alpha$ und anti-IL-1 β zu erkennen. Jedoch kam es im Vergleich zu den Kontrollen zu einer starken Verminderung der Zellzahl (Tab. 7 und Abb. 6). Die dendritischen Zellen zeigten in diesem Fall deutlich ausgeprägte *veils*. Eine Ursache für die verminderte Emigration der Langerhanszellen könnte sein, daß aufgrund der Vorinkubation mit der epidermalen Seite nach unten die dendritischen Zellen nicht aktiv aus den Mäuseohren auswandern konnten. Wahrscheinlich bleiben die DC durch die Änderung der Auswanderungsrichtung bzw. die umgekehrte Einwirkungsrichtung der Stimulantien im Gewebe stecken und können trotz nachfolgender Inkubation mit der dermalen Seite nach unten nicht mehr über die Lymphbahnen ins Medium auswandern. Eine weitere Erklärung wäre, daß die der Luft ausgesetzte Dermis während der einstündigen Vorinkubation ausgetrocknet ist, und die Zellen nicht mehr durch diese Hautschicht wandern konnten.

1.3 Zusammenfassung zur Optimierung der Organkultur:

Beide Versuche, die Wirkung der Antikörper und Zytokine durch erleichtertes Eindringen ins Gewebe zu verbessern, zeigten einen negativen Einfluß auf die Wanderung und Reifung der kutanen dendritischen Zellen. In beiden Systemen war die Zellzahl deutlich erniedrigt und die Morphologie der Zellen teilweise verändert (deformierte Zellen und kein typisch dendritisches Aussehen). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche nach dem von Monica Zanella und Ulrike Ortner etablierten System durchgeführt (siehe B 3.1, (47, 48)).

2 Untersuchungen zur Wanderung der Langerhanszellen:

Aus Vorversuchen von Ortner, Zanella, Koch und Janke (47, 48) war bereits bekannt, daß $\text{TNF}\alpha$ in niedrigen Dosen migrationsfördernd und in hohen Dosen hemmend auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen wirkt. Mit Hilfe dieser Daten konnten in dieser Diplomarbeit gezielt weitere Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$, vor allem in hoher Dosis (Untersuchung zur Toxizität), sowie Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ und das komplexe Wechselspiel verschiedenster Zytokine und Chemokine untersucht werden.

2.1 $\text{TNF}\alpha$ kann in der Organkultur die Migration der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen:

2.1.1 Die $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung ist dosisabhängig:

Zuerst wurden Versuche bezüglich der Wirkung von verschiedenen Dosen $\text{TNF}\alpha$ auf die Wanderung der Langerhanszellen durchgeführt. Dazu wurde in einer $\text{TNF}\alpha$ -Reihe die Anzahl der Units pro ml ständig erhöht.

Tab. 8: Die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen ist dosisabhängig.

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
keine	36350*	12150	100%
$\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml	36430	13990	115%
$\text{TNF}\alpha$ 75 U/ml	22140	9300	77%
$\text{TNF}\alpha$ 100 U/ml	27250	12230	101%
$\text{TNF}\alpha$ 200 U/ml	24600	7700	63%
$\text{TNF}\alpha$ 500 U/ml	23430	6510	54%
$\text{TNF}\alpha$ 1000 U/ml	29220	6160	51%
$\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml	15420	5110	42%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung der DC in 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

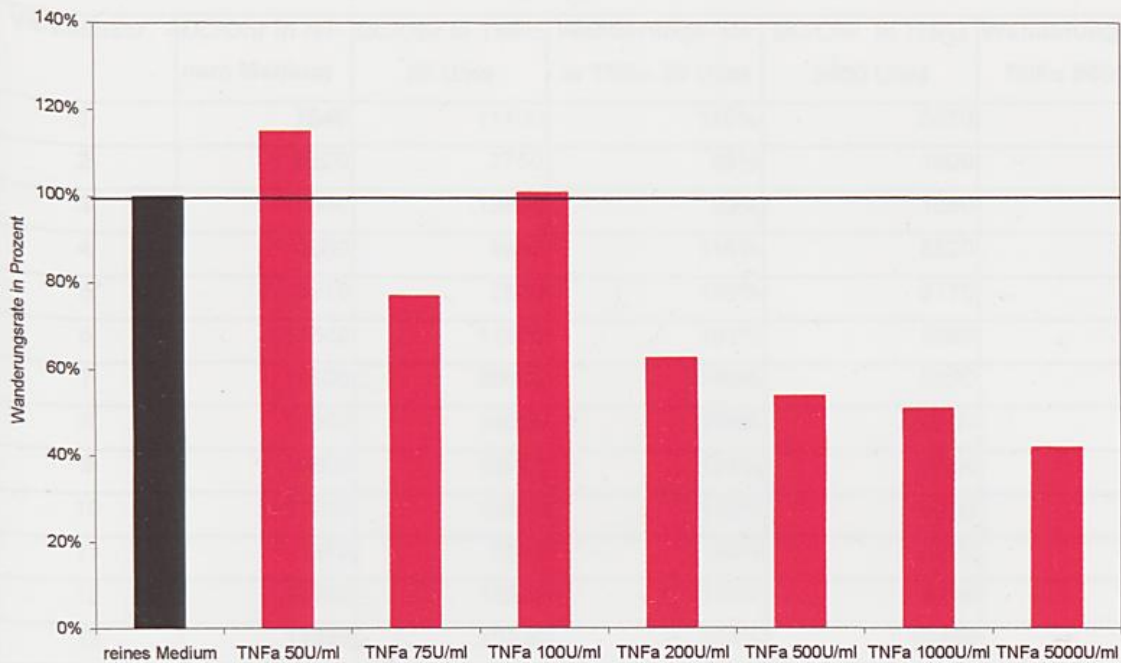


Abb. 7: $\text{TNF}\alpha$ wirkt in niedriger Dosis migrationsfördernd (50 U/ml) und in hohen Dosen (ab 200 U/ml) migrationshemmend (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 8).

Aus diesem Versuchsansatz ist ersichtlich, daß $\text{TNF}\alpha$ unterschiedliche Wirkung auf die Emigration der kutanen dendritischen Zellen hat (Tab. 8, Abb. 7). In niedriger Dosis, das heißt in einer Konzentration von 50 U/ml, fördert $\text{TNF}\alpha$ die Wanderung der Zellen (siehe auch C 2.2.2). Bereits ab einer Konzentration von 75 U/ml bis 100 U/ml sinkt die Auswanderungsrate auf die 100% der Kontrolle bis leicht darunter. Ab 200 U/ml findet eine immer deutlicher werdende Hemmung der Wanderung statt, die in der Folge noch weiter untersucht wurde (siehe auch C 2.2.2). Diese Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt und es zeigten sich immer die gleichen Ergebnisse. In allen weiteren Versuchen wurden deshalb $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml und $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml als Kontrollen für die Migrationssteigerung bzw. -hemmung verwendet.

Wie unter C 2.1.1 erwähnt, wurden $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml und $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml in allen Wanderungsstudien als Kontrollen verwendet. Daher war es möglich, die Wanderungsraten aus 32 Versuchen statistisch auszuwerten.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung aller TNF α -Daten (50 U/ml bzw. 5000 U/ml) aus 32 Versuchen

Versuchsnr.	DC/Ohr in reinem Medium	DC/Ohr in TNF α 50 U/ml	Wanderungsrate in TNF α 50 U/ml	DC/Ohr in TNF α 5000 U/ml	Wanderungsrate in TNF α 5000 U/ml
1	7840	11400	145%	5570	71%
2	6820	3750	48%	1800	23%
3	13860	13690	99%	1580	11%
4	8380	9680	116%	5520	66%
5	3970	7880	199%	2770	70%
6	11640	11800	101%	5380	46%
7	14100	20600	146%	5020	36%
8	15900	16800	106%	12400	78%
9	16800	16900	101%	10100	60%
10	11250	12920	115%	5800	52%
11	11370	9560	84%	5070	45%
12	10730	12320	115%	5110	48%
13	17370	26530	153%	12100	70%
14	21000	35980	171%	11560	55%
15	8460	13650	161%	9970	118%
16	10970	9090	83%	5200	47%
17	5380	7310	136%	2300	43%
18	10130	17650	174%	5200	51%
19	10850	15030	139%	5230	48%
20	7480	8450	113%	4290	57%
21	8880	5860	66%	2100	24%
22	10420	5460	52%	4200	45%
23	11640	11270	97%	2900	25%
24	10990	19530	178%	6830	62%
25	6040	7630	126%	2660	44%
26	15740	18880	120%	13780	88%
27	15050	18420	122%	7570	50%
28	8810	8810	100%	2580	29%
29	15060	28230	188%	10860	72%
30	10690	11640	109%	6480	61%
31	13260	16150	122%	3640	28%
32	13750	23080	168%	6500	47%
Mittelwert	11400	14250	124%	6000	52%
St.abw.	3750	7050	37%	3330	21%
Anzahl	32	32	32	32	32
Maximalwert	21000	35980	199%	13780	118%
Minimalwert	3970	3750	48%	1580	11%
T-Test		p < 0,0007	p < 0,0007	p < 0,0001	p<0,0001

Legende: Mausstämmen: C57BL/6 und BALB/c, sowohl weiblich als auch männlich; Vorinkubation: 26-28h/ +4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; ein-bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben. Student's t-Test gepaart.

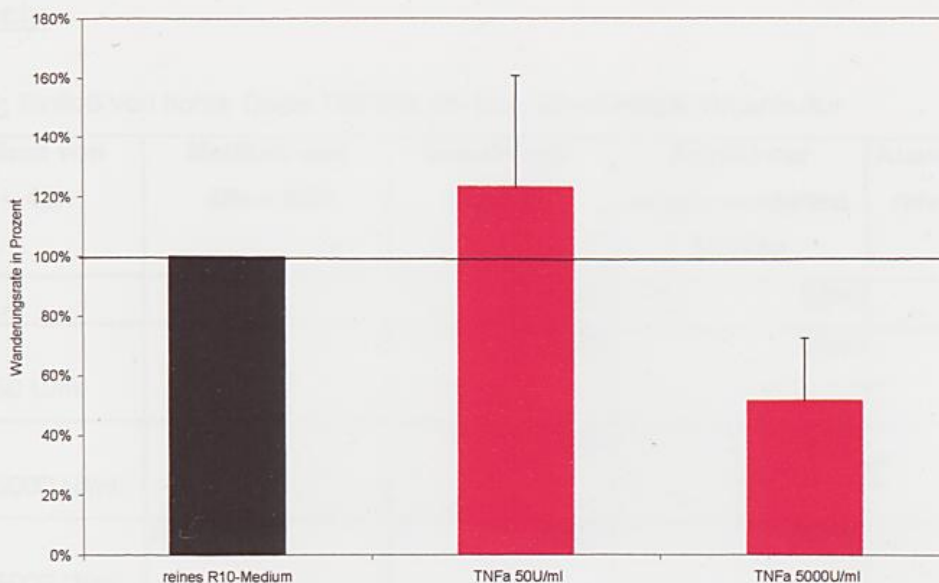


Abb. 8: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung aus Tab. 9

Aus Tab. 9 und Abb. 8 ist ersichtlich, daß TNF α 50 U/ml die Migrationsrate um 24% steigerte, wobei in einzelnen Experimenten eine Steigerung um bis zu ca. 90% möglich war. Die hohe Dosis von TNF α 5000 U/ml konnte die Wanderungsrate um beinahe 48% vermindern. Die Schwankungen bei der niedrigen Dosis TNF α kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß bei Verwendung von kleinen Mengen des Zytokins leichter Pipettierfehler auftraten als bei der hohen Dosis. Weitere Fehlerquellen liegen bei der Zählmethode und der Aufarbeitung der Zellen (siehe D 11).

2.1.2 Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen von TNF α :

Es ist bekannt, daß TNF α in niedrigen Dosen immunstimulierend und somit entzündungsfördernd wirkt, in hohen Dosen aber, wie sie beim septischen Schock auftreten, zum Tod führen kann. Deshalb wurde in mehreren Versuchen der Mechanismus der Migrationshemmung durch hohe Dosen TNF α (5000 U/ml) genauer untersucht.

Zu diesem Zweck wurden dorsale Ohrhälften zuerst für 48 Stunden auf R10-Medium mit bzw. ohne TNF α 5000 U/ml im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die ausgewanderten Zellen gezählt und die Ohren, die auf hoher Dosis TNF α inkubiert worden waren, für weitere 48 Stunden auf frischem R10-Medium mit und ohne TNF α 5000 U/ml in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die zwischen 48 und 96 Stunden ausgewanderten Zellen ebenfalls gezählt und in einem Funktionstest (OXMI) auf ihre T-Zell-Stimulationsfähigkeit untersucht. Die Ohrhaut wurde für Peroxidase-Färbungen zu *sheets* weiterverarbeitet.

1.Versuch:

Tab. 10: Einfluß von hoher Dosis TNF α in 48- bzw. 96-stündiger Organkultur

Medium von 0 – 48h	Medium von 48h – 96h	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
R10	-	15690	8380	100%
R10 + TNF α 50 U/ml	-	14820	9680	116%
R10 + TNF α 5000 U/ml	-	13920	5520	66%
R10 + TNF α 5000 U/ml	R10	32200	21990	262%
R10 + TNF α 5000 U/ml	R10 + TNF α 5000 U/ml	28060	20300	242%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h bzw. 96h/ 37°C, Ohren nach 48h auf TNF α 5000 U/ml auf frisches Medium R10 und einmal mit TNF α 5000 U/ml aufgelegt und für weitere 48h inkubiert; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

2.Versuch:

Tab. 11: Einfluß von hoher Dosis TNF α auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen

Medium von 0 - 48h	Medium von 48h – 96h	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
R10	-	65630*	15100	100%
R10 + TNF α 5000 U/ml	-	59690*	9950	66%
R10 + TNF α 5000 U/ml	R10	70830*	21900	145%
R10 + TNF α 5000 U/ml	R10 + TNF α 5000 U/ml	60920*	21800	144%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h bzw. 96h/ 37°C, Ohren nach 48h auf TNF α 5000 U/ml auf frisches Medium R10 und einmal auf TNF α 5000 U/ml aufgelegt; einmalige Zählung in 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten, daher große Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben

1.Versuch:

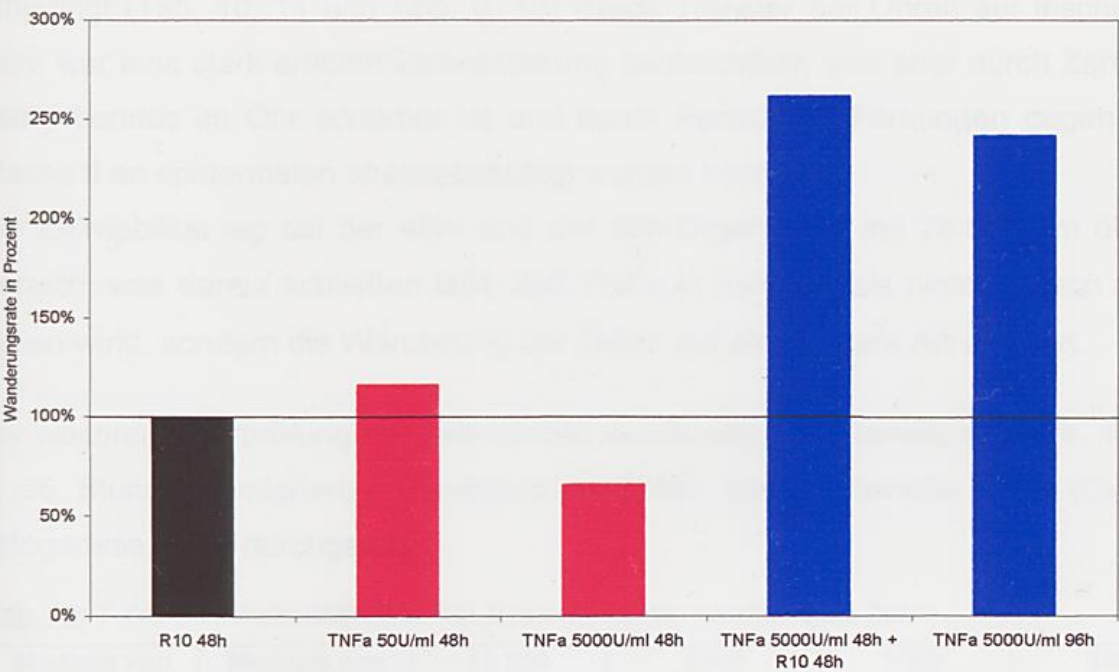


Abb. 9: TNFα 5000 U/ml wirkt hemmend auf die Migration, ist aber nicht toxisch, da nach 96h immer noch viable Zellen auswandern (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 10).

2. Versuch:

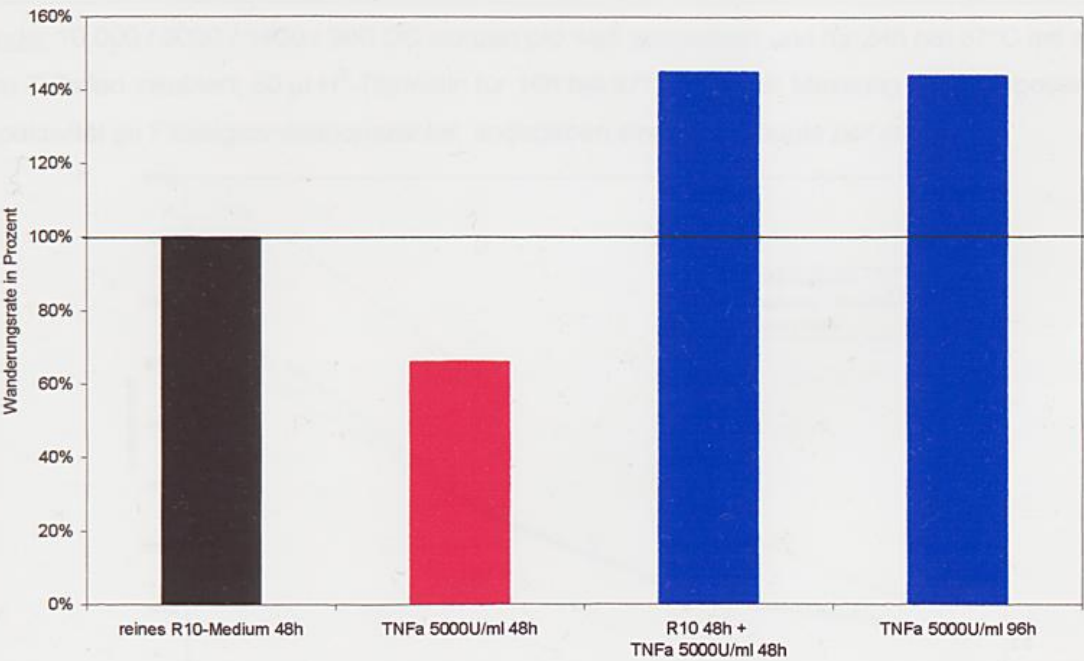


Abb. 10: Auch bei diesem Versuch nach 96h-Kultur viele viable dendritische Zellen im Medium (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 11).

In beiden Versuchen waren die Zellzahlen nach Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml erniedrigt (Tab. 10, 11 und Abb. 9, 10). Nach Transfer der Ohren auf frisches Medium war eine stark erhöhte Zellwanderung beobachtbar, was aber durch Zerfall des Zellverbandes im Ohr erklärbar ist und durch Peroxidase-Färbungen gegen MHC-Klasse II an epidermalen *sheets* bestätigt werden konnte.

Die Zellviabilität lag bei der 48h- und der 96h-Organkultur mit 78-92% im üblichen Bereich, was darauf schließen läßt, daß $\text{TNF}\alpha$ in hoher Dosis nicht toxisch auf die Zellen wirkt, sondern die Wanderung der Zellen auf eine andere Art inhibiert.

Zur weiteren Überprüfung der Zellviabilität wurde, wie oben bereits erwähnt, mit den in 96 Stunden emigrierten dendritischen Zellen ein funktioneller Test (Oxidative Mitogenese, (59)) durchgeführt.

Tab. 12: T-Zell-Stimulationsfähigkeit von ausgewanderten dendritischen Zellen

Medium von 0 – 48h	Medium von 48 – 96h	10.000 DC/well	3000 DC/well	1000 DC/well	300 DC/well
R10	R10	49780	24760	11700	6990
R10 + $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml	R10	69940	45840	24720	11430
R10 + $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml	R10 + $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml	45250	24870	12820	7660

Legende: 10.000 / 3000 / 1000 / 300 DC wurden pro well ausplattiert und für 24h bei 37°C mit syngenen T-Zellen inkubiert; 50 µl H^3 -Thymidin für 16h bei 37°C pro well; Messung der inkorporierten Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler; angegeben sind cpm (*counts per minute*).

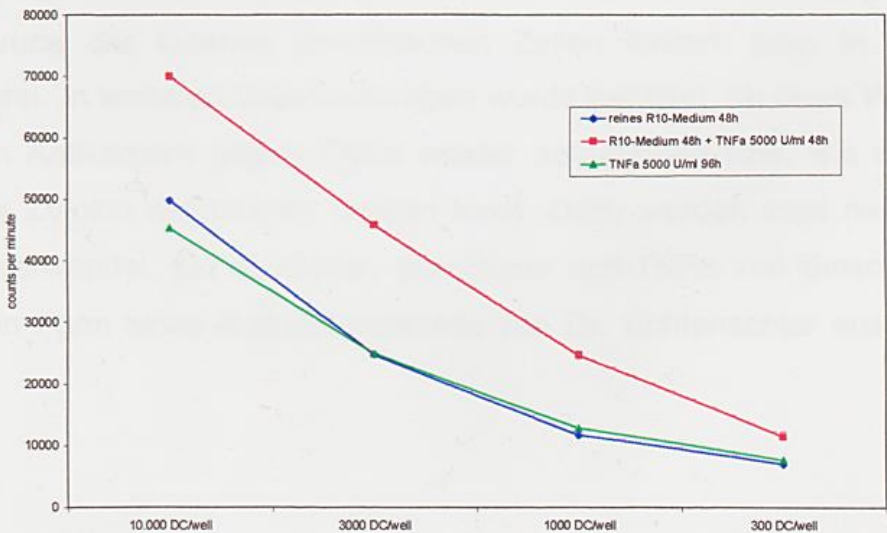


Abb. 11: Die in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml emigrierten Zellen zeigten gleiche bzw. stärkere T-Zell-Stimulationsfähigkeit wie die in reines Medium ausgewanderten dendritischen Zellen (Daten aus Tab. 12).

Dendritische Zellen aus Kulturen mit der hohen Dosis $\text{TNF}\alpha$ zeigten im Vergleich zu dendritischen Zellen, die in reines R10-Medium ausgewandert waren, keine Verminderung ihrer Fähigkeit, ruhende T-Zellen zu aktivieren. Im Gegenteil, das in Tab. 12 dargestellte Einzelexperiment zeigte sogar einen positiven Effekt des $\text{TNF}\alpha$. Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, daß die verminderte Emigration von kutanen dendritischen Zellen in Gegenwart von hohen Dosen $\text{TNF}\alpha$ nicht auf eine mögliche Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern kann. Dieser Vorgang dürfte *in vivo* sehr ähnlich ablaufen, denn beim Eindringen von Bakterien in die Haut wird die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion induziert. Im Gegensatz dazu wirkt $\text{TNF}\alpha$ in hohen Dosen hemmend auf die Wanderung, wobei dies nicht auf eine mögliche Toxizität des Zytokins zurückzuführen ist.

Die in diesen Versuchen verwendete Ohrhaut wurde nach der Kultur in Immunfluoreszenzfärbungen auf morphologische Unterschiede hin analysiert. Die Ergebnisse sind unter Punkt C 2.1.4 angeführt.

2.1.3 Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen $\text{TNF}\alpha$ in die Kultur hemmt die Migration der kutanen dendritischen Zellen:

Aus den Versuchen unter Punkt C 2.1.1 ist ersichtlich, daß $\text{TNF}\alpha$ in geringer Dosis die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen fördern bzw. in hoher Dosis hemmen kann. In weiteren Untersuchungen wurde getestet, ob diese Wirkung durch Zugabe von Antikörpern gegen $\text{TNF}\alpha$ wieder aufgehoben bzw. wie weit endogen produziertes Zytokin neutralisiert werden kann. Dazu wurden zwei neutralisierende Antikörper verwendet: ein käuflicher, gereinigter anti- $\text{TNF}\alpha$ von Biosource und ein Antikörper in Form eines Kulturüberstandes von Dr. Echtenachter aus Regensburg (V1q) (54).

Wirkung des käuflichen anti-TNF α von Biosource auf die Migration der Langerhanszellen:

Tab. 13: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen anti-TNF α auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
keine	12190	3970	100%
anti-TNF α (bl 150U)	17470	7070	178%
anti-TNF α (bl 450U)	2740	580	15%
TNF α 50 U/ml	19380	7880	199%
TNF α 50 U/ml + anti-TNF α (bl 150U)	7440	2410	61%
TNF α 50 U/ml + anti-TNF α (bl 450U)	6830	1520	38%
TNF α 5000 U/ml	7000	2510	63%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C, anti-TNF α : Zugabe in einer Konzentration, die laut Angaben des Herstellers 150 bzw. 450U/ml TNF α blockieren kann; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

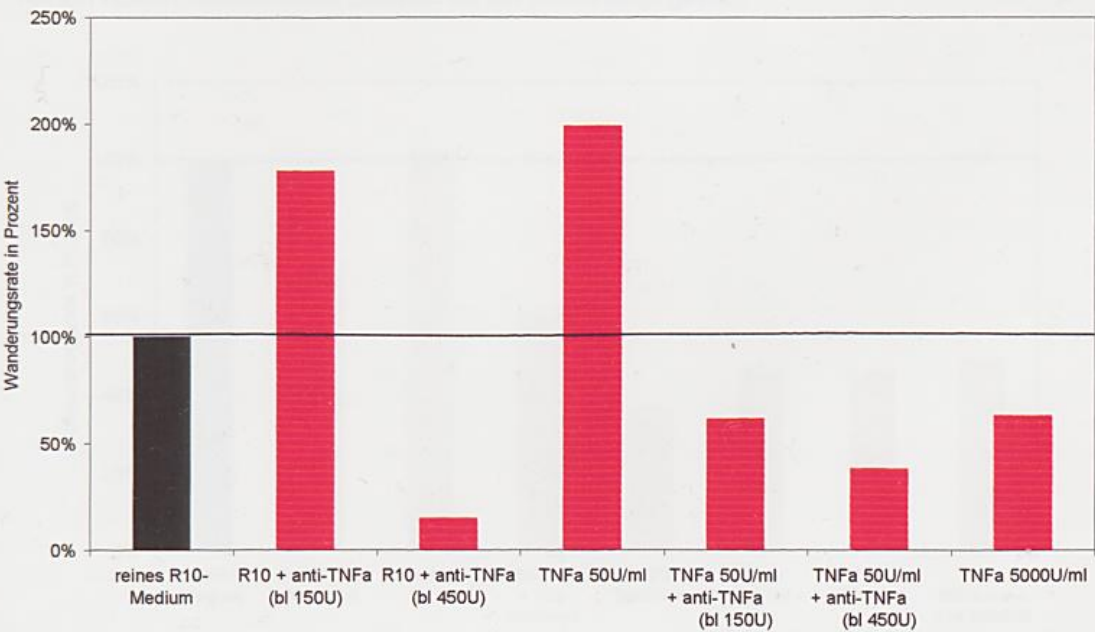


Abb. 12: Der Antikörper gegen TNF α von Biosource kann die Wirkung von TNF α aufheben (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 13).

Wirkung des supernatant anti-TNF α V1q auf die Wanderung:

In Experimenten konnten Echtenachter et al. feststellen, daß 16 $\mu\text{g/ml}$ V1q (= 500 μl /1,5 ml) benötigt werden, um 100 U/ml rekombinanten murinen TNF α zu blocken (54). Daher wurden in den folgenden Versuchen 200 μl und 500 $\mu\text{l/well}$ eingesetzt.

Tab. 14: Einfluß von V1q auf die Migration

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC /Ohr	Auswanderungs- rate in Prozent
keine	22010	11640	100%
V1q (500 $\mu\text{l/well}$)	21290	8290	71%
TNF α 50 U/ml	24350	11800	102%
TNF α 50 U/ml + V1q (200 $\mu\text{l/well}$)	18210	7080	61%
TNF α 3000 U/ml	10000	4260	37%
TNF α 3000 U/ml + V1Qq(500 $\mu\text{l/well}$)	11460	5320	46%
TNF α 5000 U/ml	12210	5380	46%
TNF α 5000 U/ml + V1q (500 $\mu\text{l/well}$)	9880	5750	49%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

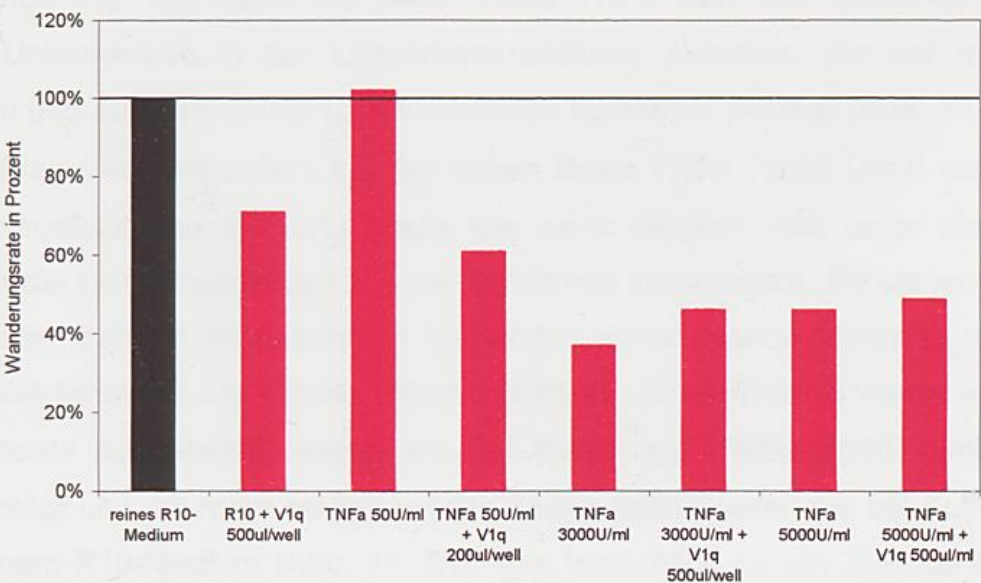


Abb. 13: V1q kann bereits in einer Konzentration von 200 $\mu\text{l/well}$ 50 U/ml TNF α blocken, die hohen Dosen TNF α jedoch nicht mehr (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 14).

Wie erwartet, konnten beide Antikörper (Tab. 13, 14 und Abb. 12, 13) gegen $\text{TNF}\alpha$ die migrationsfördernde Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ 50U/ml aufheben. Bei Zugabe von Antikörpern in reines R10-Medium war meistens eine leichte Senkung der Zellzahl im Medium erkennbar, was darauf hindeutet, daß *in situ* bereits genug $\text{TNF}\alpha$ vorhanden ist, um die Zellzahl zu erhöhen. Bei hohen Dosen $\text{TNF}\alpha$ (3000 U/ml und 5000 U/ml), war mit der eingesetzten Menge Antikörper kein Einfluß auf die Hemmung der Wanderung mehr möglich.

2.1.4 Morphologische Aspekte:

Nach der 48h-Kultur auf R10, $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml und $\text{TNF}\alpha$ 5000U/ml wurden die Ohren wie unter B 3.4 und B 3.5 beschrieben zu epidermalen und dermalen *sheets* verarbeitet und in einer Einfach-Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II gefärbt. Als zusätzliche Kontrolle wurde frische Ohrhaut mitgefärbt.

Im Fluoreszenzmikroskop waren in der Epidermis eindeutige Unterschiede in der Langerhanszellichte vor allem zwischen frischer und kultivierter Haut erkennbar (Abb. 14, 16). Die erhöhte Auswanderungsrate bei Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml ins Medium war deutlich auf den epidermalen und dermalen *sheets* erkennbar (Abb. 18, 19). In der Epidermis waren kaum noch Langerhanszellen zu finden, und in der Dermis waren zahlreiche, dicht gefüllte *cords* zu sehen. Dies deutet auf eine starke Induktion der Emigration von Langerhanszellen hin. Hingegen war die verminderte Auswanderung bei Kultur auf hoher Dosis $\text{TNF}\alpha$ nicht klar erkennbar. Es waren kaum Unterschiede in der Langerhanszellichte zwischen der auf reinem R10-Medium und auf $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml kultivierten Epidermis sichtbar (Abb. 16, 20).

Diese Frage war besonders bei der hohen Dosis $\text{TNF}\alpha$ (5000 U/ml) von Interesse. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte hier ganz deutlich, daß unter diesen Bedingungen die Langerhanszellen aus der Epidermis auswandern. Da sie jedoch in stark reduzierter Zahl im Kulturmedium vorhanden waren, wurde vermutet, daß sie auf ihrer Wanderung in der Dermis „steckenbleiben“. In der Dermis waren in kultivierter Haut *cords* ausgebildet, wobei sie bei Kultur auf $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml deutlicher ausgeprägt und mit mehr emigrierenden Zellen gefüllt waren als bei Kultur der Haut auf reinem R10-Medium (Abb. 17, 21), was tatsächlich für ein „Steckenbleiben“ der Zellen sprechen würde.

Unkultivierte Haut:

Epidermis:

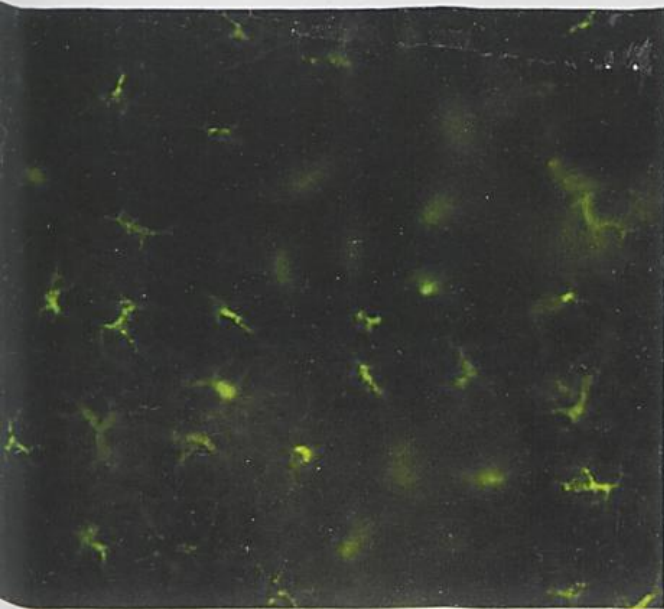


Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC bilden dichtes Netzwerk aus.

Kontrolle R10:

Epidermis:

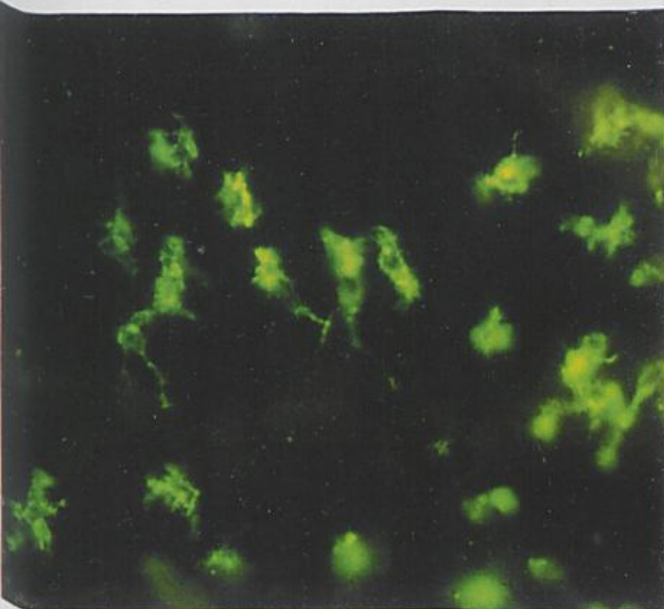


Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte verringert, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

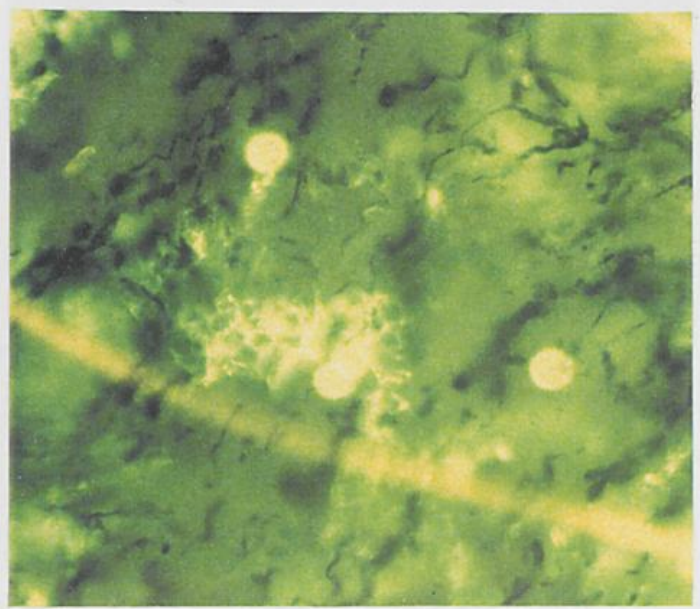


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; keine cords sichtbar, dermale DC sind MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

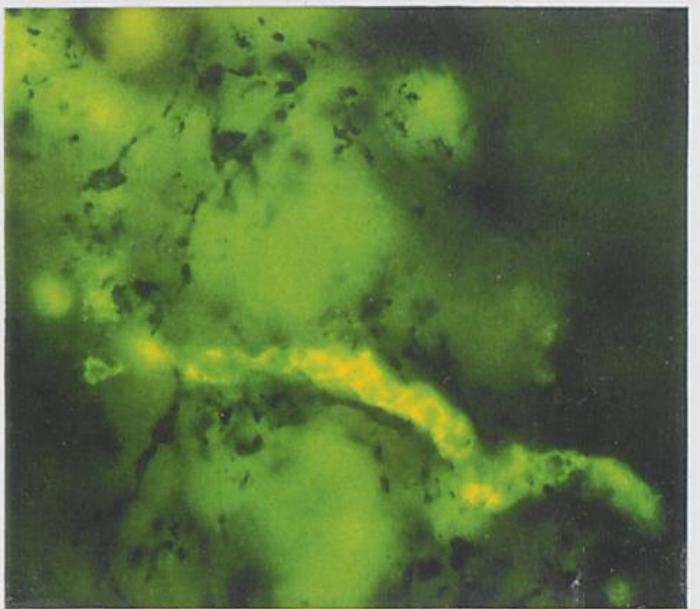


Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; deutliche cords ausgebildet.

TNF α 50U/ml:

Epidermis:

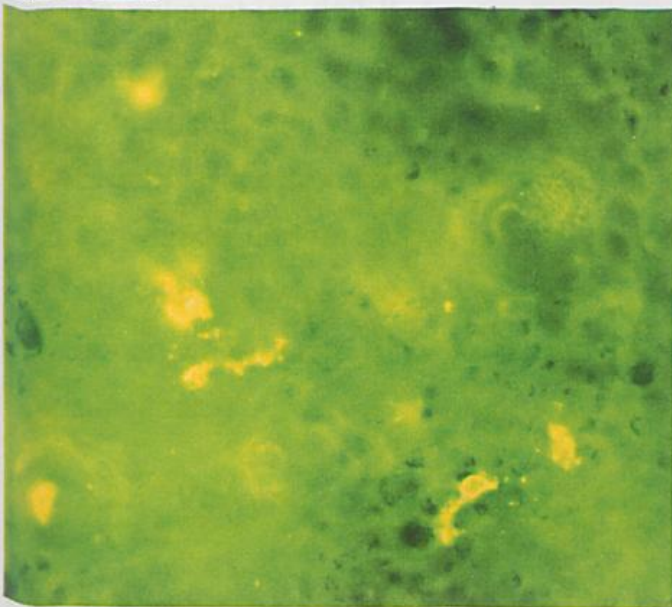


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte nimmt ab gegen die R10-kultivierte Haut, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

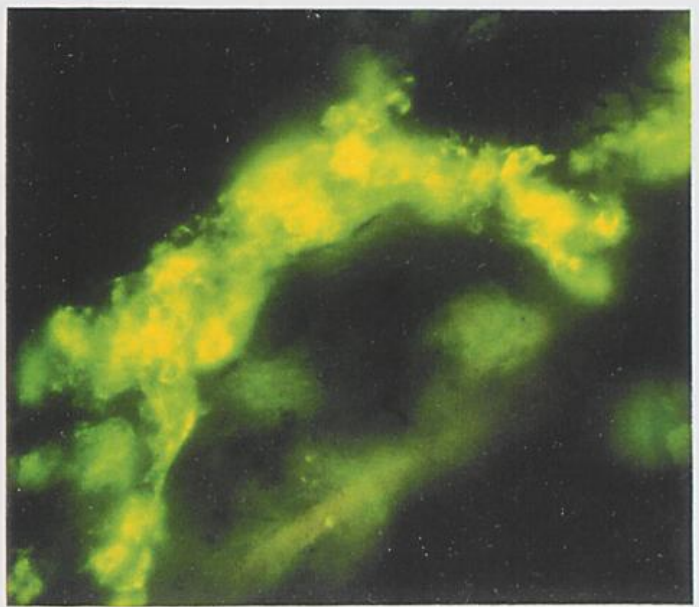


Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC in großer Zahl in den Lymphbahnen angeordnet.

TNF α 5000U:

Epidermis:

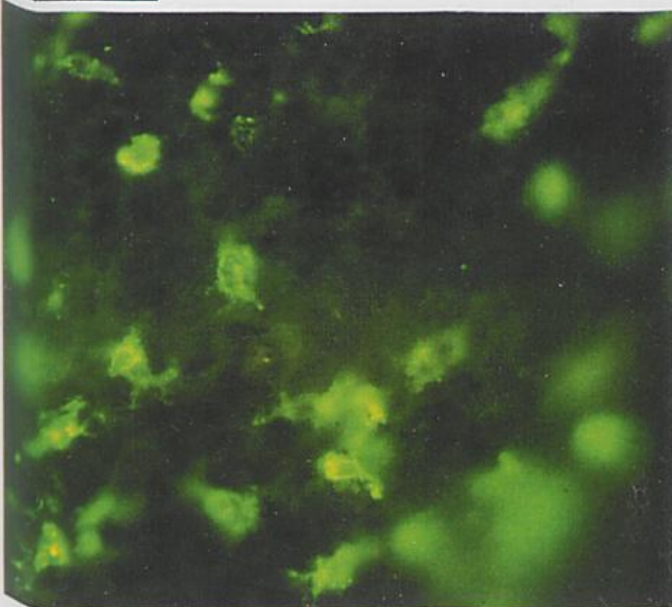


Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC-Dichte ungefähr gleich wie in R10-kultivierter Haut, LC vergrößert und stärker MHC-Klasse-II-positiv.

Dermis:

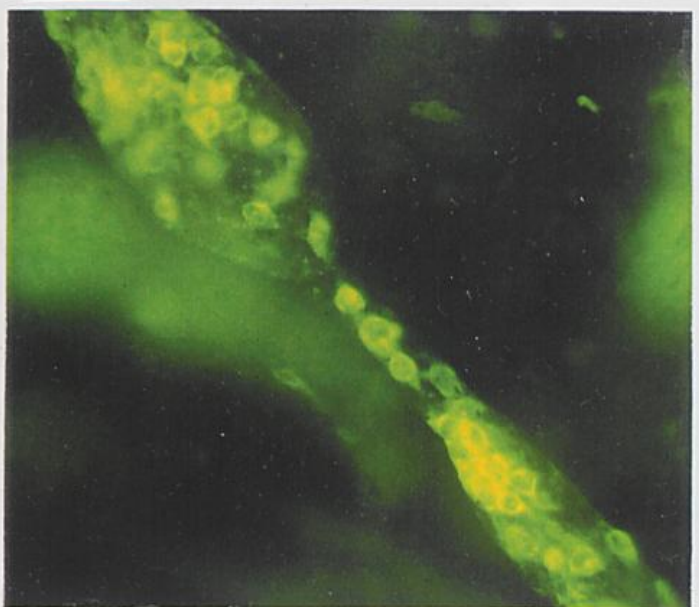


Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II, (2G9-FITC, 1:50), 350-fache Vergrößerung; LC in großer Zahl in den Lymphbahnen angeordnet.

2.2 Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der Langerhanszellen:

Da bekannt ist, daß IL-1 α von Keratinozyten und IL-1 β von Langerhanszellen in der Haut produziert wird, wurde der Einfluß von beiden Zytokinen in der Organkultur untersucht. Aus den Versuchen von Zanella (48) waren leider keine eindeutigen Ergebnisse ersichtlich, da die Zahl der auswandernden dendritischen Zellen sehr schwankte und es schwierig war, die richtigen Konzentrationen an IL-1 β zu finden. Aus den nachfolgenden Versuchen von Koch und Janke mit höheren Konzentrationen waren erste Hinweise auf eine Wirkung von IL-1 α und IL-1 β auf die Migration ableitbar.

2.2.1 Vorversuche von Koch und Janke:

IL-1 α :

Tab. 15: Einfluß von IL-1 α in verschiedenen Dosen auf die Migration

Zusätze	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	9420	100%
TNF α 50 U/ml	16290	173%
TNF α 5000 U/ml	3880	41%
IL-1 α 100 U/ml	10580	112%
IL-1 α 500 U/ml	8580	91%
IL-1 α 1000 U/ml	9880	105%
IL-1 α 2500 U/ml	17790	189%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

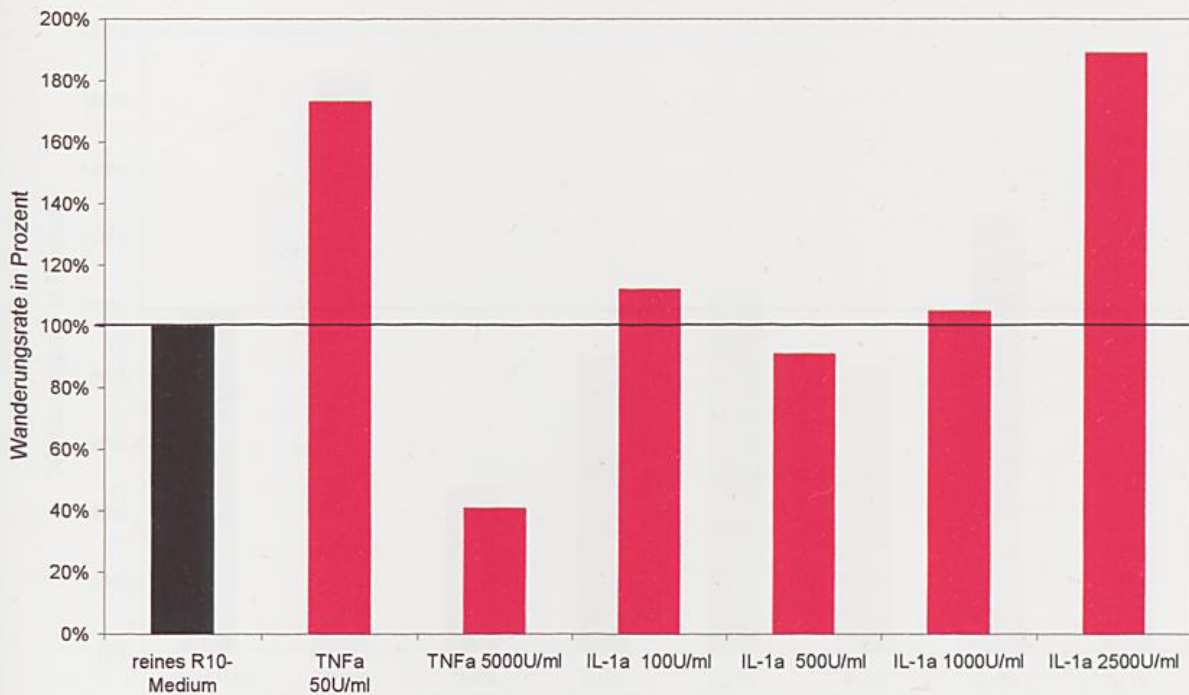


Abb. 22: IL-1 α kann die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen erst in hoher Dosis (2500 U/ml) beeinflussen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 15).

IL-1 β :

Tab. 16: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen IL-1 β auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	13750	100%
TNF α 50 U/ml	23080	168%
TNF α 5000 U/ml	6500	47%
IL-1 β 100 U/ml	11750	86%
IL-1 β 500 U/ml	14330	104%
IL-1 β 1000 U/ml	11420	83%
IL-1 β 2000 U/ml	17500	127%
IL-1 β 3000 U/ml	23330	170%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 26h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

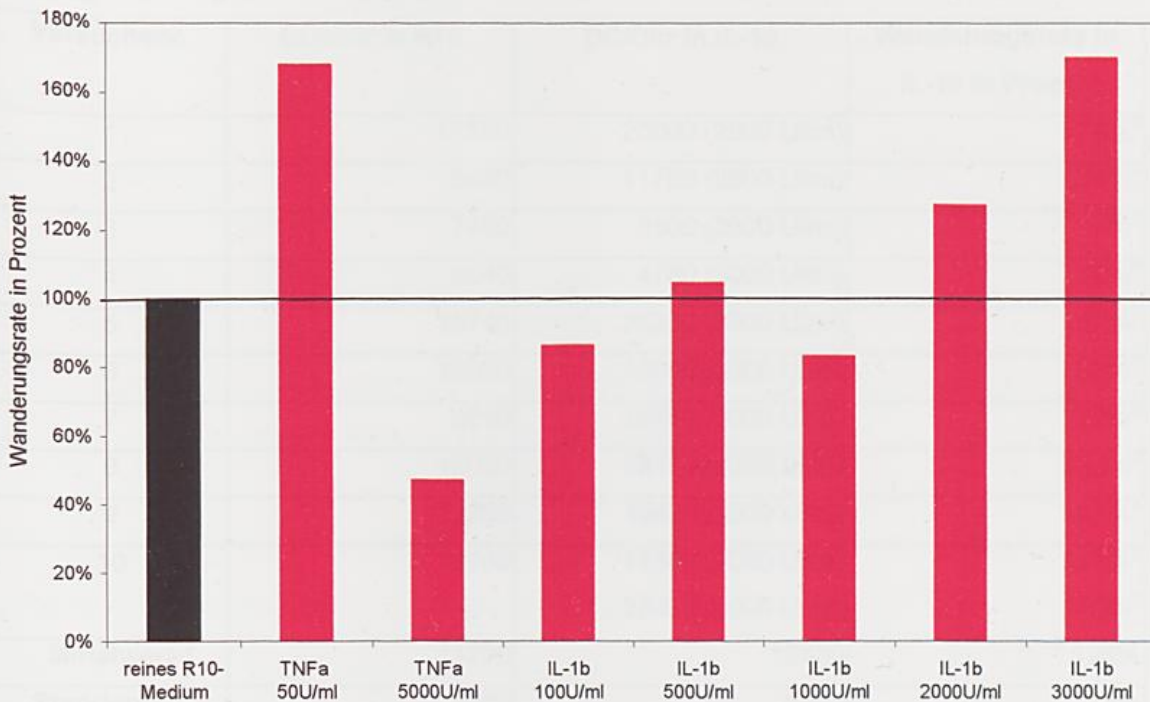


Abb. 23: IL-1 β wirkt ebenfalls erst in hoher Dosis (2000-3000 U/ml) migrationsfördernd (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 16).

Aus den Tab. 15, 16 und den Abb. 22, 23 ist ersichtlich, daß sowohl IL-1 α als auch IL-1 β im Gegensatz zu TNF α erst in sehr hoher Dosis migrationsfördernd wirken. IL-1 α erhöht die Wanderungsrate ab einer Konzentration von 2500 U/ml um 89%. In den Versuchen mit IL-1 β war ab einer Konzentration von 2000 U/ml eine Erhöhung der Wanderungsrate um 27% erkennbar, die sich bei einer Konzentrationserhöhung auf 3000 U/ml noch weiter steigerte. Bei niedrigeren Konzentrationen schwankten die Zahlen der emigrierten dendritischen Zellen um den Wert der Kontrolle R10. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden in dieser Arbeit weitere Versuche mit IL-1 β in hoher Dosis (2800 bzw. 3000 U/ml) durchgeführt.

2.2.2 IL-1 β wirkt in hoher Dosis in der Organkultur migrationsfördernd:

Es wurden mehrere Versuche mit IL-1 β , das von drei verschiedenen Firmen bezogen wurde, durchgeführt, wobei die eingesetzte Konzentration je nach erhaltener Menge 2800 U/ml oder 3000 U/ml betrug. Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die aus 10 Versuchen erhaltenen Daten geben.

Tab. 17: Auflistung aller 10 Experimente mit IL-1 β in hoher Dosis

Versuchsnr.	DC/Ohr in R10	DC/Ohr in IL-1 β	Wanderungsrate in IL-1 β in Prozent
1	11250	20000 (2800 U/ml)	178% ¹
2	8460	11780 (2800 U/ml)	139% ²
3	7480	5500 (2800 U/ml)	74% ¹
4	6040	4780 (3000 U/ml)	79% ³
5	15740	25250 (3000 U/ml)	160% ³
6	15050	13980 (3000 U/ml)	93% ³
7	8810	10780 (3000 U/ml)	122% ³
8	15060	18470 (3000 U/ml)	123% ³
9	13260	19420 (3000 U/ml)	147% ³
10	13750	17500 (2000 U/ml) 23330 (3000 U/ml)	127% ² 170% ²
Mittelwert	11700	15530	128%
Standardabweichung	3280	6450	34%
Maximalwert	15740	25250	178%
Minimalwert	6040	4780	74%
T-Test		p < 0,0070	p < 0,0117

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich und männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; ein- bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

Student's t-test: gepaart. ¹ Biomol, Hamburg, Deutschland, ² Genzyme, Cambridge, USA

³ PBH, Wien, Austria

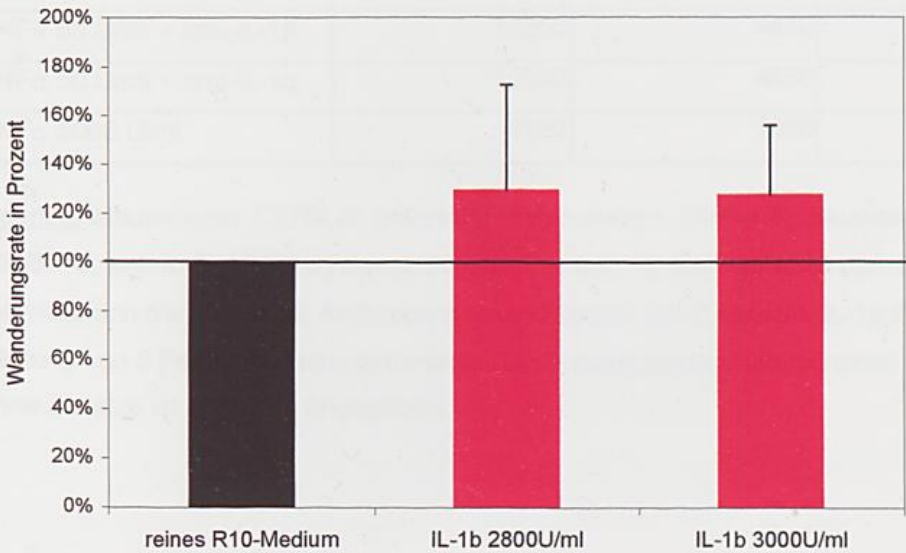


Abb. 24: Graphische Darstellung der stat. Auswertung aller 10 Versuche mit hoher Dosis IL-1 β

Der Mittelwert aus allen Versuchen zeigte eine Migrationssteigerung von 28%. IL-1 β kann wie TNF α die Wanderung von Langerhanszellen in der Organkultur beeinflussen, aber erst in sehr hoher Dosis steigern (Tab. 17, Abb. 24). Die Schwankungen in der Auswanderungsrate sind sehr wahrscheinlich wie bei den TNF α -Versuchen auf die Probleme des Systems, der Zählung und der Aufarbeitung der Proben zurückzuführen (D 11).

2.2.3 Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1 α und IL-1 β in die Organkultur verhindert eine Migrationssteigerung:

Es wurden im Laufe der Versuche Antikörper von zwei verschiedenen Firmen verwendet. Sowohl ein monoklonaler anti-IL-1 β von Genzyme, als auch ein monoklonaler anti-IL-1 α bzw. anti-IL-1 β von R&D-Systems konnte die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen aus der Haut beeinflussen.

Tab. 18: Antikörper gegen IL-1 α und IL-1 β können die Migration hemmen.

Zusätze	Gesamtzellzahl/ Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungs- rate in Prozent
keine	19360	6040	100%
anti-IL-1 β	10000	3380	56%
IL-1 β 3000 U/ml	13500	4780	79%
TNF α 50 U/ml	14160	7630	126%
TNF α 50 U/ml + anti-IL-1 β	12250	4440	74%
TNF α 50 U/ml + anti-IL-1 α	10590	4650	77%
TNF α 5000 U/ml	8390	2660	44%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, anti-IL-1 α : R&D-Systems, 20 μ g/ml, anti-IL-1 β : Genzyme, 20 μ g/ml, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen, IL-1 β :PBH; einmalige Zählung von 5 Feldern in Hämozytometer. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

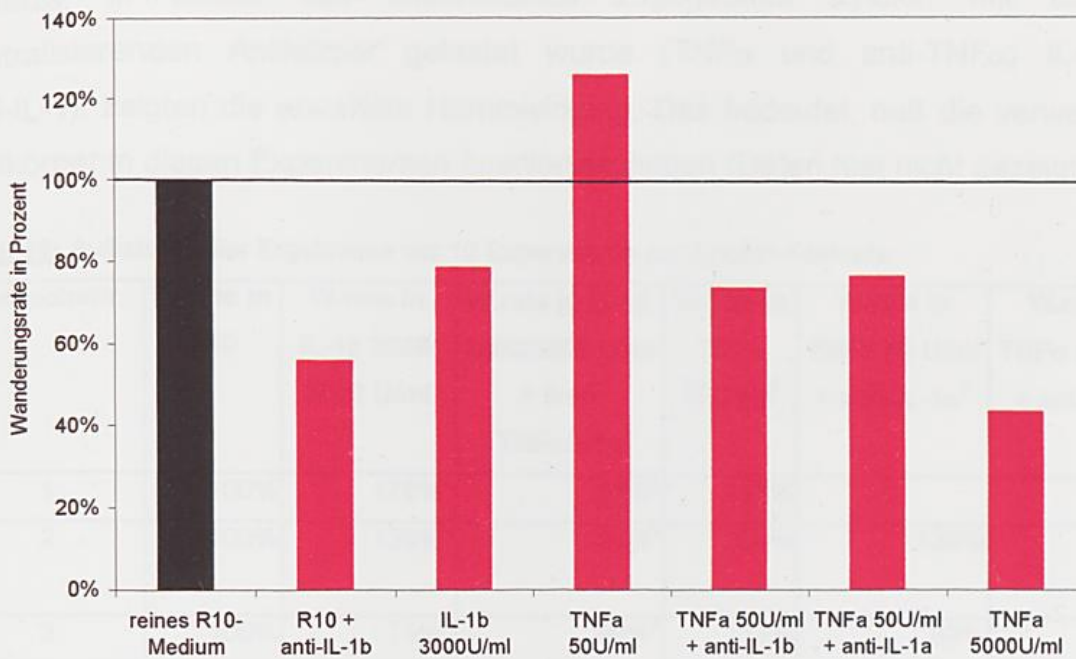


Abb. 25: Der Einfluß von IL-1 auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen kann durch Antikörper aufgehoben werden (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 18).

Im angeführten Versuch war die Hemmung der Migration sowohl durch anti-IL-1 α als auch durch anti-IL-1 β eindeutig, was auf einen großen Einfluß beider Zytokine auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen hinweist (Tab. 18, Abb. 25). Auch die migrationsfördernde Wirkung von TNF α 50 U/ml konnte durch beide Antikörper aufgehoben werden. Dies deutet, gleich wie die Zugabe von anti-TNF α ins reine Medium, auf Vorkommen und Wirkung der Zytokine bereits *in situ* hin. In diesem Versuch zeigte IL-1 β keine Migrationssteigerung, was durch die gleichen Probleme der Organkultur wie bei TNF α bedingt ist (D 11). Eine Kombination von IL-1 β und anti-IL-1 β war leider aus Kostengründen nicht durchführbar. Die Wiederholungen dieses Versuches zeigten weitgehend das gleiche Ergebnis. Weitere Versuchsergebnisse sind unter Punkt C 2.3 angeführt.

2.3 Kaskade:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von Zanella und Romani diskutierte Zytokin-Kaskade (48) weiter untersucht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mehrere Versuche mit TNF α und IL-1 β in Kombination mit den jeweils anderen Antikörpern durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aus 10 Experimenten aufgelistet. Die in manchen Experimenten mitgeführten Kontroll-

ansätze, in denen das experimentell zugegebene Zytokin mit dem es neutralisierenden Antikörper getestet wurde (TNF α und anti-TNF α ; IL-1 und anti-IL-1), zeigten die erwartete Hemmwirkung. Das bedeutet, daß die verwendeten Antikörper in diesen Experimenten funktioniert haben (Daten hier nicht gezeigt).

Tab. 19: Auflistung aller Ergebnisse der 10 Experimente zur Zytokin-Kaskade

Versuchsnr.	W.rate in R10	W.rate in IL-1 β 2800/3000 U/ml	W.rate in IL-1 β 2800/3000 U/ml + anti-TNF α /V1q	W.rate in TNF α 50U/ml ⁶	W.rate in TNF α 50 U/ml + anti-IL-1 α ⁷	W.rate in TNF α 50 U/ml + anti-IL-1 β
1	100%	178% ¹	67% ⁴	115%	-	132% ²
2	100%	139% ²	134% ⁴	161%	138%	152% ² 89% ⁷
3	100%	74% ¹	99% ⁴	113%	89%	154% ²
4	100%	-	-	66%	-	39% ⁷
5	100%	79% ³	106% ⁵	126%	77%	74% ²
6	100%	160% ³	105% ⁵	120%	-	-
7	100%	93% ³	92% ⁵	122%	-	-
8	100%	122% ³	40% ⁵	100%	-	-
9	100%	123% ³	178% ⁵	187%	-	-
10	100%	147% ³	104% ⁵	121%	-	-
Mittelwert	100%	124%	103%	121%	101%	107%
Standardabweichung	0	34,1%	36,5%	30,8%	26,4%	43,9%
Maximalwert	100%	178%	178%	187%	138%	154%
Minimalwert	100%	74%	40%	66%	77%	39%
T-Test		p < 0,041	p < 0,418	p < 0,026	p < 0,475	p < 0,340

Legende: Maustamm: C57BL/6, sowohl weiblich als auch männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; ein- bis zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer; R10 mit 100% Wanderungsrate (W.rate) als Kontrolle verwendet. Student's t-test: gepaart.

¹ ... Biomol, Hamburg, Deutschland
 ⁶ ... Dr. G.R. Adolf, Bender&Co, Wien, Austria

² ... Genzyme, Cambridge, USA
 ⁷ ... R&D-Systems, Abingdon, UK

³ ... PBH, Wien, Austria

⁴ ... V1q von Dr. Echtenacher, Regensburg, Deutschland (54)

⁵ ... anti-TNF α von Biosource, Cambridge, USA

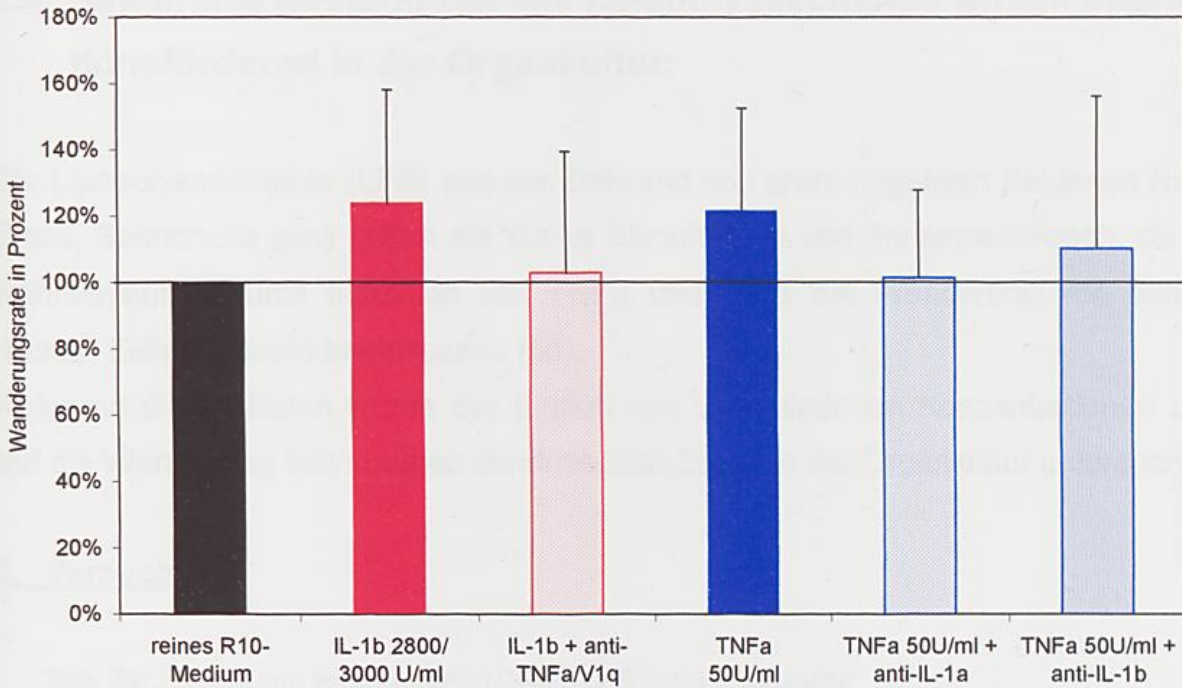


Abb. 26: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der 10 Experimente zur Zytokin-Kaskade (Daten aus Tab. 19).

Wie aus Tab. 19 und Abb. 26 ersichtlich ist, konnten sowohl $\text{TNF}\alpha$ als auch $\text{IL-1}\beta$ in bestimmten Konzentrationen die Wanderungsrate der kutanen dendritischen Zellen um mindestens 21% bis 24% steigern. Diese Wirkung konnte durch *crossblocking* mit dem jeweils anderen Antikörper beinahe auf die 100% der Kontrolle gesenkt werden. Da also die Wirkung beider Zytokine durch Zugabe von Antikörpern aufgehoben werden konnte, deutete dies nicht auf das Vorliegen einer Kaskade hin. Es muß bei diesen Experimenten erwähnt werden, daß die Unterschiede (d.h. Hemmungen der Wanderungsrate) keine statistische Signifikanz erreichten.

2.4 Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide wirken migrationsfördernd in der Organkultur:

Die Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand von gram-negativen Bakterien (z. B. E.coli, Salmonella etc.) gelten als starke Stimulatoren von Immunreaktionen, da sie wahrscheinlich durch Induktion von TNF α und IL-1 α die Wanderung von dendritischen Zellen indirekt beeinflussen (50).

Aufgrund dieser Daten wurde der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur untersucht.

1. Versuch:

Tab. 20: Zugabe von verschiedenen Dosen LPS in die Organkultur

Zusätze	Gesamtzellzahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	12100	5375 $\pm$ 672	100% $\pm$ 13%
LPS 10 ng/ml	10430	3140 $\pm$ 721	58% $\pm$ 13%
LPS 10 ng/ml + V1q	24210*	2880 $\pm$ 467	54% $\pm$ 9%
LPS 100 ng/ml	12200	4665 $\pm$ 375	87% $\pm$ 7%
LPS 100 ng/ml + V1q	15260	3705 $\pm$ 134	69% $\pm$ 3%
LPS 1 μ g/ml	5610	1280 $\pm$ 297	24% $\pm$ 6%
anti-TNF α /V1q	37550*	4545 $\pm$ 813	85% $\pm$ 13%
TNF α 50 U/ml	19100	7310 $\pm$ 170	136% $\pm$ 3%
TNF α 5000 U/ml	8310	2295 $\pm$ 205	43% $\pm$ 4%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich; Vorinkubation: 27,5 h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, V1q: 500 μ l/well, einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr und Wanderungsrate sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher sehr hohe Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

2. Versuch:

Tab. 21: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen

Zusätze	Gesamtzellzahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	27070	10130	100%
LPS 10 ng/ml	42190*	10460	103%
LPS 10 ng/ml + V1q	77370*	7790	77%
LPS 100 ng/ml	27910	14310	141%
LPS 100 ng/ml + V1q	48810*	12960	128%
LPS 100 ng/ml + anti-IL1 α + anti-IL-1 β	19900	5780	57%
LPS 1 μ g/ml	18500	6940	69%
anti-TNF α /V1q	64880*	8920	88%
TNF α 50 U/ml	42000	17650	174%
TNF α 5000 U/ml	20200	5200	51%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich, betäubt mit Äther; Vorinkubation: 28h/+4°C, Inkubationszeit: 48h/37°C, V1q: 500 μ l/well, anti-IL1 α + - β : von R&D-Systems, 20 μ g/ml; einstündige Vorinkubation der Ohren mit Antikörpern, dann Zugabe von Zytokinen; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, * ... viele Erythrozyten im Medium, daher Gesamtzellzahl sehr hoch. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

Die Ergebnisse beider Versuche, die in Abb. 27 und 28 noch graphisch dargestellt sind, zeigten ähnliche Tendenzen. Die Zugabe von 10 ng/ml LPS in die Organkultur führte zu einer Wanderungsrate, die sich leicht unter oder genau auf dem Kontrollniveau befand. In einer höheren Dosis von 100 ng/ml stieg die Zahl der emigrierten kutanen dendritischen Zellen bei beiden Versuchen, wobei die Werte im ersten Versuch immer noch unter der Kontrolle lagen. Die Emigration konnte bei beiden LPS-Konzentrationen (10 und 100 ng/ml) durch Zugabe von sowohl anti-TNF α (V1q) als auch anti-IL-1 α und anti-IL-1 β verringert werden, was auf eine direkte Wirkung von LPS auf TNF α und IL-1 schließen läßt. LPS in hoher Dosis von 1 μ g/ml scheint wie TNF α in hoher Dosis einen negativen Effekt auf die Migration zu haben, da die Wanderungsrate bei beiden in gleichem Maße verringert war.

1. Versuch:

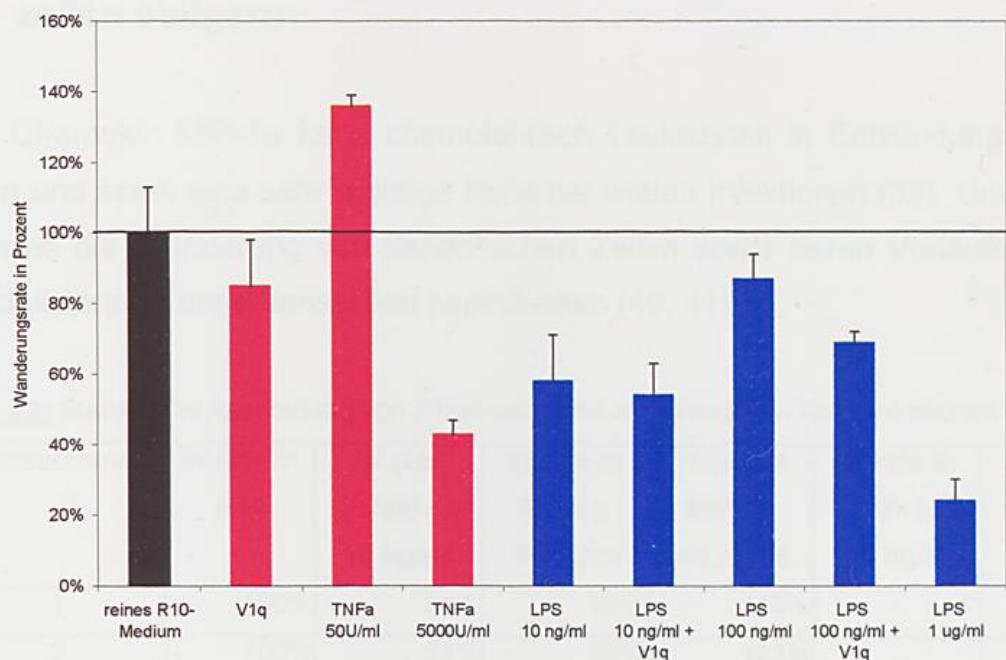


Abb. 27: Einfluß von LPS auf die Migration von kutanen dendritischen Zellen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 20).

2. Versuch:

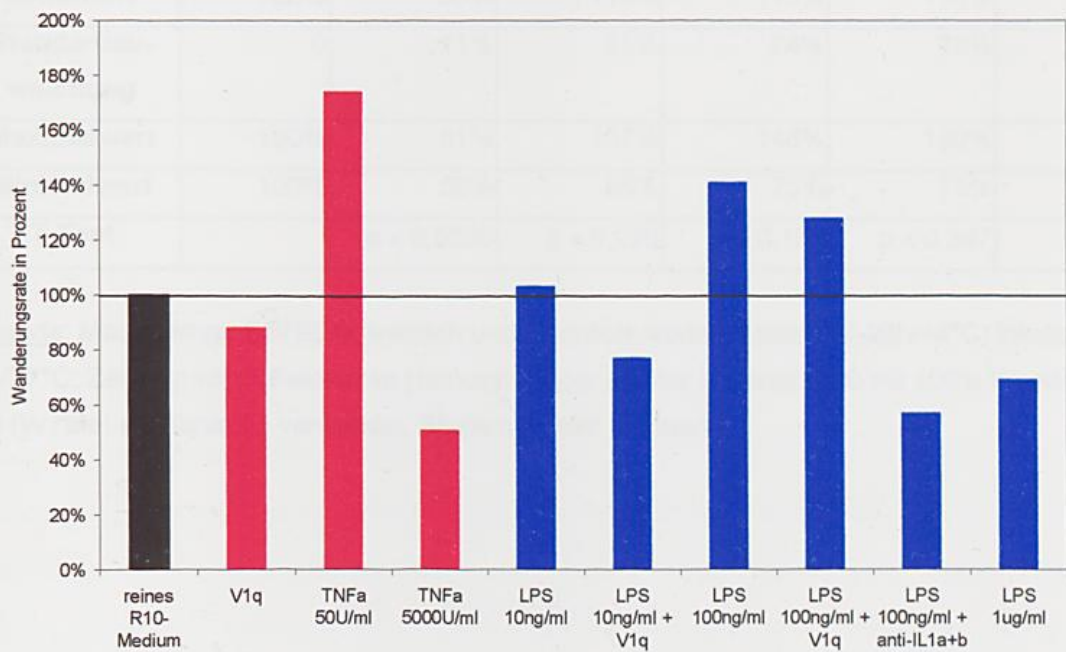


Abb. 28: LPS kann in der Organkultur migrationsfördernd wirken (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 21).

2.5 Das Chemokin MIP-1 α kann die Emigration von Langerhanszellen steigern:

Das Chemokin MIP-1 α kann chemotaktisch Leukozyten in Entzündungsorte rekrutieren und spielt eine sehr wichtige Rolle bei viralen Infektionen (39). Unter anderem kann es die Wanderung von dendritischen Zellen sowie deren Vorläufern und den spezialisierten Langerhanszellen beeinflussen (40, 41).

Tab. 22: Statistische Auswertung von 7 Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen MIP-1 α

Versuchsnr.	W.rate in R10	W.rate in MIP-1 α 10 ng/ml	W.rate in MIP-1 α 20 ng/ml	W.rate in MIP-1 α 40 ng/ml	W.rate in MIP-1 α 70 ng/ml	W.rate in MIP-1 α 100 ng/ml
1	100%	81%	90%	115%	-	118%
2	100%	62%	85%	123%	-	109%
3	100%	-	108%	75%	-	89%
4	100%	-	91%	-	150%	-
5	100%	-	157%	148%	-	-
6	100%	56%	126%	113%	-	-
7	100%	-	-	-	75%	-
Mittelwert	100%	66%	110%	115%	113%	105%
Standardabweichung	0	11%	25%	24%	38%	12%
Maximalwert	100%	81%	157%	148%	150%	118%
Minimalwert	100%	56%	85%	75%	75%	89%
T-Test		p < 0,0236	p < 0,220	p < 0,133	p < 0,397	p < 0,298

Legende: Mausstamm: C57BL/6, weiblich und männlich; Vorinkubation: 27-28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer ein- bis zweimal; R10 mit 100% Wanderungsrate (W.rate) als Kontrolle verwendet, Student's t-test: gepaart.

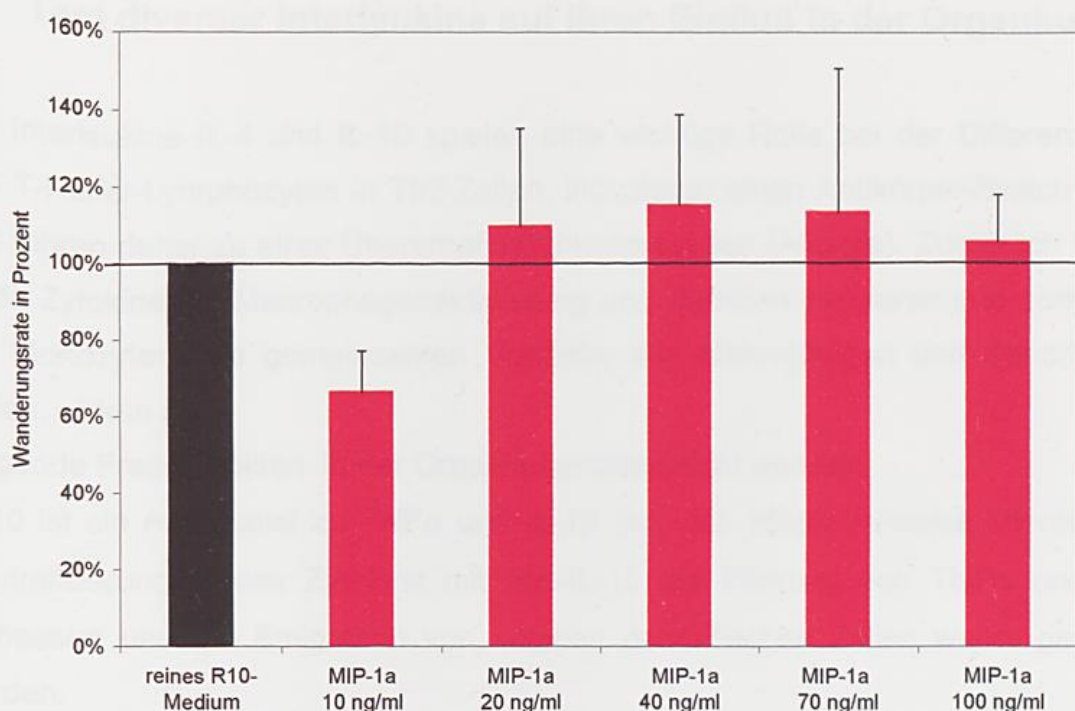


Abb. 29: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung aller Versuche mit MIP-1 α (Daten aus Tab. 22).

Die Wirkung von MIP-1 α scheint ähnlich wie die von TNF α und IL-1 dosisabhängig zu sein (Tab. 22, Abb. 29). Bei niedriger Konzentration, wie etwa 10 ng/ml, entsprach die Wanderungsrate der Kontrolle bzw. war leicht verringert. In einer Menge von 20 ng/ml kann MIP-1 α die Emigration nur teilweise steigern, liegt aber bei der statistischen Auswertung über dem Niveau der Kontrolle. Ab einer Dosis von 40 ng/ml kann dieses Chemokin die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen fast immer fördern. Die Wanderungsrate sinkt bei hoher Dosis MIP-1 α (100 ng/ml) wieder auf das Niveau der Kontrolle. Daraus kann man schließen, daß MIP-1 α einen direkten (chemotaktische Rekrutierung von Vorläuferzellen aus der Dermis) oder auch indirekten Einfluß über inflammatorische Zytokine, wie über TNF α und IL-1 β , auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen hat. In einem der oben aufgelisteten Experimente wurde MIP-1 α 40 ng/ml in Kombination mit anti-TNF α (blockierend 150 U/ml TNF α) bzw. anti-IL-1 β (20 μ g/ml verwendet) eingesetzt. Bei beiden Ansätzen konnten die Antikörper die migrationsfördernde Wirkung von MIP-1 α aufheben, was eher auf einen indirekten Einfluß dieses Zytokins über TNF α und IL-1 β auf die Wanderung der Langerhanszellen hindeutet.

Auch bei diesen Experimenten muß erwähnt werden, daß keine statistische Signifikanz erreicht wurde und es deshalb weiterer Versuche bedarf.

2.6 Test diverser Interleukine auf ihren Einfluß in der Organkultur:

Die Interleukine IL-4 und IL-10 spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Helfer-Lymphozyten in Th2-Zellen, induzieren einen Antikörper-Switch zu IgE und führen daher zu einer Überempfindlichkeitsreaktion (Allergie). Zusätzlich können beide Zytokine die Makrophagenaktivierung und -funktion inhibieren und somit auch auf Monozyten, die gemeinsamen Vorläufer der Makrophagen und dendritischen Zellen, wirken (42).

Folgende Fragen sollten in der Organkultur untersucht werden:

IL-10 ist ein Antagonist zu TNF α und IL-1 β (43, 44). Möglicherweise könnte durch Neutralisierung dieses Zytokins mit anti-IL-10 die Wirkung von TNF α und IL-1 β verbessert und die Emigration von kutanen dendritischen Zellen weiter gesteigert werden.

Durch Zugabe von IL-4 in die Organkultur könnten sich eventuell Monozyten bzw. Vorläuferzellen in der Dermis oder Epidermis zu Langerhanszellen entwickeln – so, wie es in der Zellkultur für dendritische Zellen gezeigt werden konnte (62).

1. Versuch:

Tab. 23: IL-4 und anti-IL-10 haben beide einen negativen Einfluß auf die Migration in der Organkultur.

Zusätze	Gesamtzellzahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	27500*	8880 $\pm$ 178	100% $\pm$ 2%
IL-4 200 U/ml	7400	2400 $\pm$ 290	27% $\pm$ 3%
IL-4 400 U/ml	17440	4360 $\pm$ 198	49% $\pm$ 2%
anti-IL-10 (10 μ g/ml)	11840	3080 $\pm$ 170	35% $\pm$ 2%
anti-IL-10 (20 μ g/ml)	16720	4400 $\pm$ 970	50% $\pm$ 11%
TNF α 50 U/ml	16780	5860 $\pm$ 0	66% $\pm$ 0
TNF α 5000 U/ml	8260	2100 $\pm$ 198	24% $\pm$ 2%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 28h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer; * ... einige Erythrozyten im Medium, daher höhere Gesamtzellzahl. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

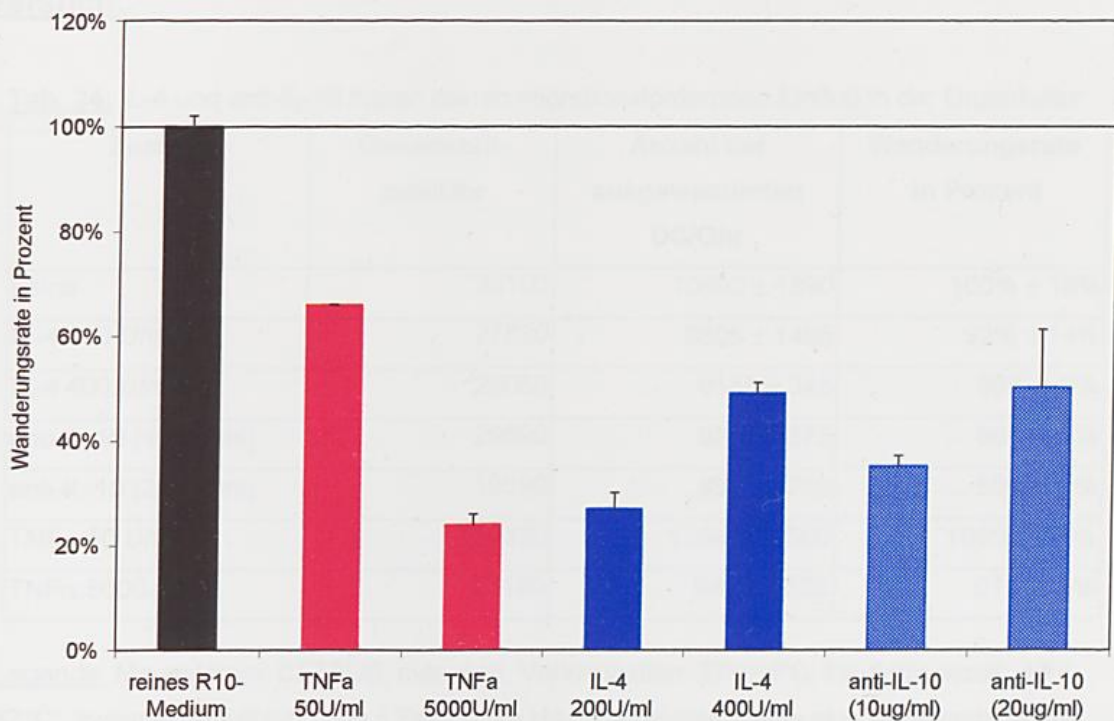


Abb. 30: IL-4 und anti-IL-10 haben einen negativen Effekt auf die Reifung und Wanderung der kutanen dendritischen Zellen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 23).

Wie aus Tab. 23 und der Abb. 30 hervorgeht, bewirkte die Zugabe von 200 U/ml IL-4 in die Organkultur im ersten Versuch eine zur Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ 5000 U/ml vergleichbare Verringerung der Zellzahl. Die Verdoppelung der Dosis führte zu einer Steigerung der Wanderungsrate, die aber immer noch weit unter dem Kontrollwert lag. Unter dem Mikroskop waren sehr schöne dendritische Zellen mit deutlich ausgebildeten *veils* sichtbar.

Die gleiche Wirkung war bei Zugabe von anti-IL10 zu beobachten, da sich auch hier bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ die Zahl der ausgewanderten kutanen dendritischen Zellen auf dem Niveau der hohen Dosis $\text{TNF}\alpha$ befand. Ebenso zeigte sich bei einer Verdoppelung der Dosis wie bei IL-4 eine gesteigerte Emigration der kutanen dendritischen Zellen.

2. Versuch:

Tab. 24: IL-4 und anti-IL-10 haben keinen migrationsfördernden Einfluß in der Organkultur

Zusätze	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	33100	10690 ± 1890	100% ± 18%
IL-4 200 U/ml	27820	9805 ± 1495	92% ± 14%
IL-4 400 U/ml	23050	9135 ± 345	86% ± 3%
anti-IL-10 (10 µg/ml)	29590	9225 ± 375	86% ± 4%
anti-IL-10 (20 µg/ml)	19590	5310 ± 710	50% ± 7%
TNFα 50 U/ml	29330	11640 ± 1560	109% ± 15%
TNFα 5000 U/ml	23100	6475 ± 535	61% ± 5%

Legende: Mausstamm: C57BL/6, männlich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/ 37°C; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Daten sind Mittelwerte beider Zählungen. Die Auswanderungsrate im reinen Kulturmedium ohne Zusätze ist als 100% angegeben.

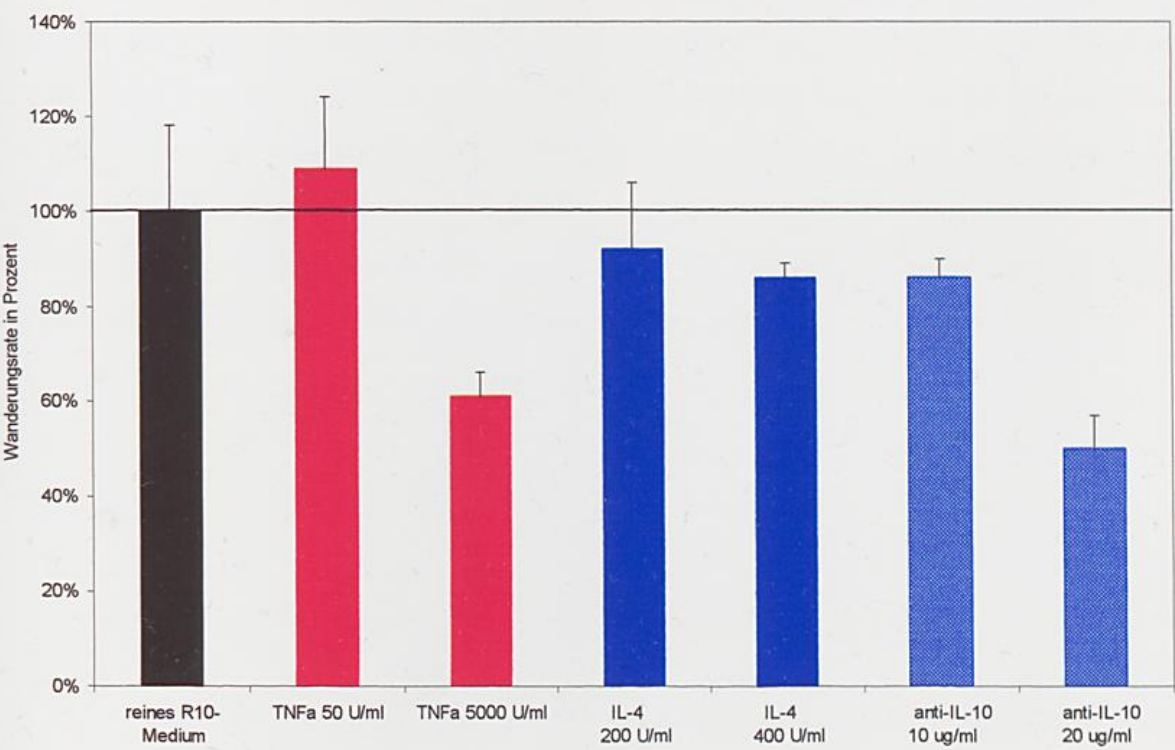


Abb. 31: IL-4 und anti-IL-10 haben keinen deutlichen Einfluß auf die Migration (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 24).

Im zweiten Experiment (Tab. 24 und Abb. 31) war die Wanderungsrate sowohl bei IL-4 als auch bei anti-IL-10 wiederum geringer als bei der Kontrolle R10, aber die Zellzahlen waren allgemein etwas höher als im ersten Versuch. Bei Zugabe von IL-4 waren wieder sehr schöne dendritische Zellen unter dem Mikroskop zu sehen.

Aus diesen beiden Experimenten kann man schließen, daß beide Interleukine in der Organkultur einen eher negativen Effekt hatten und keinesfalls zu einer Migrationssteigerung führten.

Die Wirkungslosigkeit wäre einerseits dadurch erklärbar, daß bei diesen Versuchen noch nicht die optimale Dosis verwendet wurde. Andererseits könnte es auch sein, daß beide Substanzen in der Organkultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen tatsächlich nicht beeinflussen können.

3 Untersuchung der Reifung von Langerhanszellen:

3.1 Einfluß von GM-CSF in der Organkultur:

GM-CSF ist das Schlüsselzytokin für die Reifung von dendritischen und somit auch von Langerhanszellen (45, 46, 53). Die GM-CSF-Produktion wird in Keratinozyten in der Epidermis durch diverse Stimuli induziert. Die GM-CSF-Rezeptor-Expression wird durch IL-1 β und TNF α verstärkt, was zu einer verbesserten Wirkung von GM-CSF und somit zur Induktion der Reifung der Langerhanszellen in der Epidermis führt. Unklar ist, ob GM-CSF auch einen Einfluß auf die Wanderung hat.

1. Versuchsansatz:

Im nachfolgenden Experiment wurde GM-CSF in zwei verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden in die Organkultur gegeben, um den Einfluß auf die Migration zu untersuchen. Parallel dazu wurden Mäuseohren nach 24-stündiger Inkubation auf Medium mit verschiedenen TNF α - und GM-CSF-Konzentrationen auf frisches Medium mit den gleichen Zytokin-Zusätzen transferiert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Zu den in den ersten 24 Stunden ausgewanderten DC wurden ins Medium entweder 1000 U/ml GM-CSF oder 100 U/ml bzw. 5000 U/ml TNF α pipettiert, um deren Wirkung auf bereits emigrierte kutane dendritische Zellen zu beobachten. Anschließend wurden die Zellen, die zwischen 0-24 und 24-28 Stunden ausgewandert waren, *gepoolt* und zusammen gezählt.

Tab. 25: Einfluß von GM-CSF auf die Migration in der Organkultur

Zusätze	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr	Wanderungsrate in Prozent
keine	48500	16970	100%
TNF α 50 U/ml	61090	26870	158%
TNF α 100 U/ml	41760	17940	106%
TNF α 5000 U/ml	33270	12100	72%
GM-CSF 2000 U/ml	49880	18160	108%
GM-CSF 5000 U/ml	37980	13650	81%
keine + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	45900	16800	100%
keine + TNF α 100 U/ml zu e.DC [^]	51240	21690	129%
keine + TNF α 5000 U/ml zu e.DC [^]	41330	17500	104%
TNF α 50 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	43500	21750	130%
TNF α 100 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	31510	12640	75%
TNF α 5000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	22400	8690	52%
GM-CSF 2000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	36240	17580	105%
GM-CSF 5000 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml zu e.DC [^]	37920	18420	110%

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C,

[^] ... GM-CSF- bzw. TNF α -Zusätze zu den in den ersten 24h emigrierten DC (e.DC), Transfer der Ohren auf frisches, gleiches Medium, poolen beider Fraktionen vor Zählung; einmalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer. Die Auswanderungsrate in den Kontrollansätzen ist jeweils als 100% angegeben.

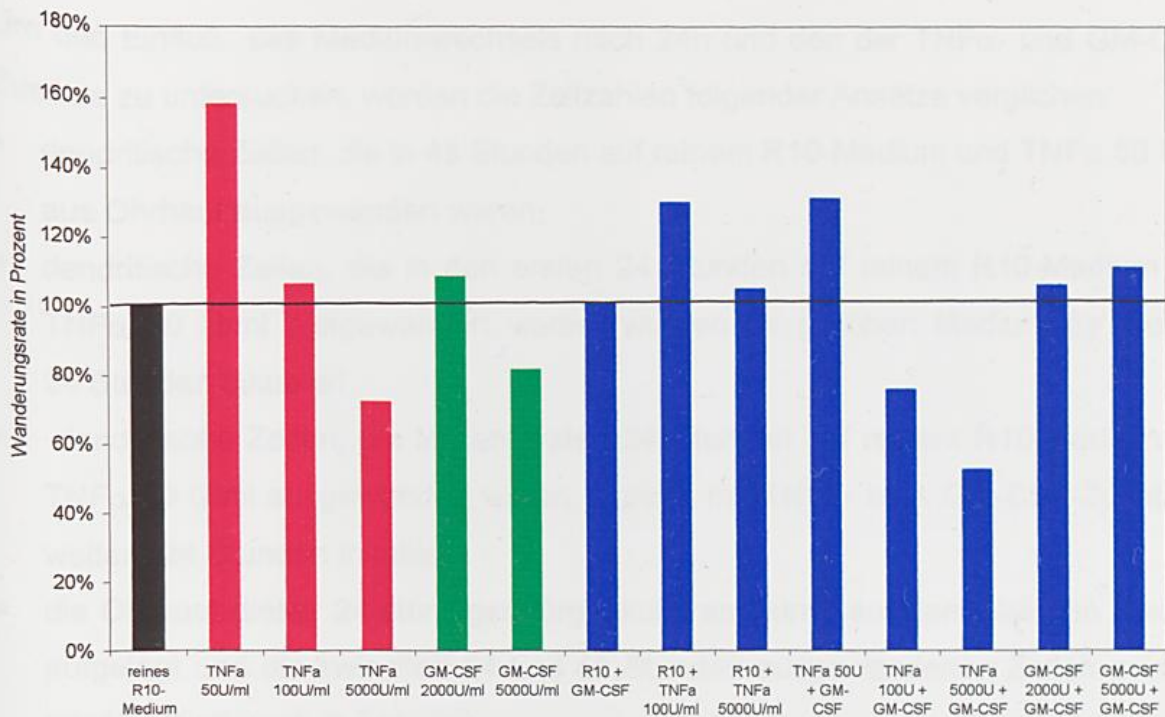


Abb. 32: GM-CSF kann bei Zugabe in die Organkultur und zu den bereits emigrierten dendritischen Zellen die Zellzahlen geringfügig erhöhen (graphische Darstellung der Daten aus Tab. 25).

Aus Tab. 25 und Abb. 32 ist ersichtlich, daß 2000 U/ml GM-CSF in der 48-stündigen Organkultur zu einer leichten Zellzahlerhöhung, 5000 U/ml hingegen zu einer leichten Erniedrigung führten. Die Zellzahlerniedrigung bei sehr hohen GM-CSF-Dosen von 5000 U/ml könnte auf einen negativen Effekt dieses Zytokins in zu hoher Konzentration zurückzuführen sein.

Die TNF α - und GM-CSF-Zusätze hatten auf die bereits emigrierten dendritischen Zellen eher unterschiedlichen Einfluß. Durch den Mediumwechsel nach 24h und die GM-CSF- und TNF α -Zusätze besaßen die Zellen deutlichere *veils* als die Kontrollen. Die Zellviabilität lag bei allen Ansätzen zwischen 80-90%. Interessant war, daß auch die TNF α -Zugabe zu den bereits ausgewanderten dendritischen Zellen zu einer leichten Zellzahlerhöhung führte. Bei den GM-CSF-Zusätzen waren die Zellzahlen eher schwankend. Sehr wahrscheinlich können beide Zytokine bei den bereits ausgewanderten Zellen die Überlebensrate erhöhen bzw. die Reifung der kutanen dendritischen Zellen beeinflussen. Diese Ergebnisse wurden durch zwei weitere Versuche mit GM-CSF-Zusätzen in der Organkultur bestätigt

2. Versuchsansatz:

Um den Einfluß des Mediumwechsels nach 24h und den der TNF α - und GM-CSF-Zusätze zu untersuchen, wurden die Zellzahlen folgender Ansätze verglichen:

- dendritische Zellen, die in 48 Stunden auf reinem R10-Medium und TNF α 50 U/ml aus Ohrhaut ausgewandert waren,
- dendritische Zellen, die in den ersten 24 Stunden auf reinem R10-Medium und TNF α 50 U/ml ausgewandert waren, wurden im gleichen Medium für weitere 24 Stunden inkubiert
- dendritische Zellen, die in den ersten 24 Stunden auf reinem R10-Medium und TNF α 50 U/ml ausgewandert waren, wurden mit TNF α - bzw. GM-CSF-Zusatz für weitere 24 Stunden inkubiert
- die Ohrhaut dieser 24-stündigen Organkulturen wurde auf dem gleichen Medium aufgelegt und die zwischen 24 und 48 Stunden ausgewanderten Zellen getrennt gezählt (Fettdruck in Tab. 26).

Tab. 26: Vergleich der zwischen 0-24h und der 24-48h auswandernden Zellen

Medium von 0—24h, Inkubation mit Ohr	Medium von 24— 48h, Inkubation mit Ohr	Medium von 24—48h, Inkubation ohne Ohr	Gesamtzell- zahl/Ohr	Anzahl der ausgewanderten DC/Ohr
R10	R10	-	20160*	10535 $\pm$ 705
R10 + TNF α 50 U/ml	R10 + TNF α 50 U/ml	-	159380*	18035 $\pm$ 405
R10	- R10	R10	16430 16440	7760 $\pm$ 1350 9500 $\pm$ 0
R10 + TNF α 50 U/ml	- R10 + TNF α 50 U/ml	R10 + TNF α 50 U/ml	10120 14630	5265 $\pm$ 875 8090 $\pm$ 0
R10	- R10	R10 + GM-CSF 1000 U/ml ¹	19430 19830	7745 $\pm$ 265 9750 $\pm$ 0
R10	- R10	R10 + TNF α 50 U/ml ¹	19750 22280	9265 $\pm$ 365 11450 $\pm$ 0
R10 + TNF α 50 U/ml	- R10 + TNF α 50 U/ml	R10+ TNF α 50 U/ml + GM-CSF 1000 U/ml ¹	27900 24940	10280 $\pm$ 0 15600 $\pm$ 0

Legende: Mausstamm: BALB/c, weiblich; Vorinkubation: 27h/+4°C; Inkubationszeit: 48h/37°C, 0-24h ausgewanderte Zellen, **24-48h ausgewanderte Zellen**; zweimalige Zählung von 5 Feldern im Hämozytometer, Zellzahlen sind Mittelwerte beider Zählungen, * ... viele Erythrozyten im Medium, führt zu einer hohen Gesamtzellzahl.

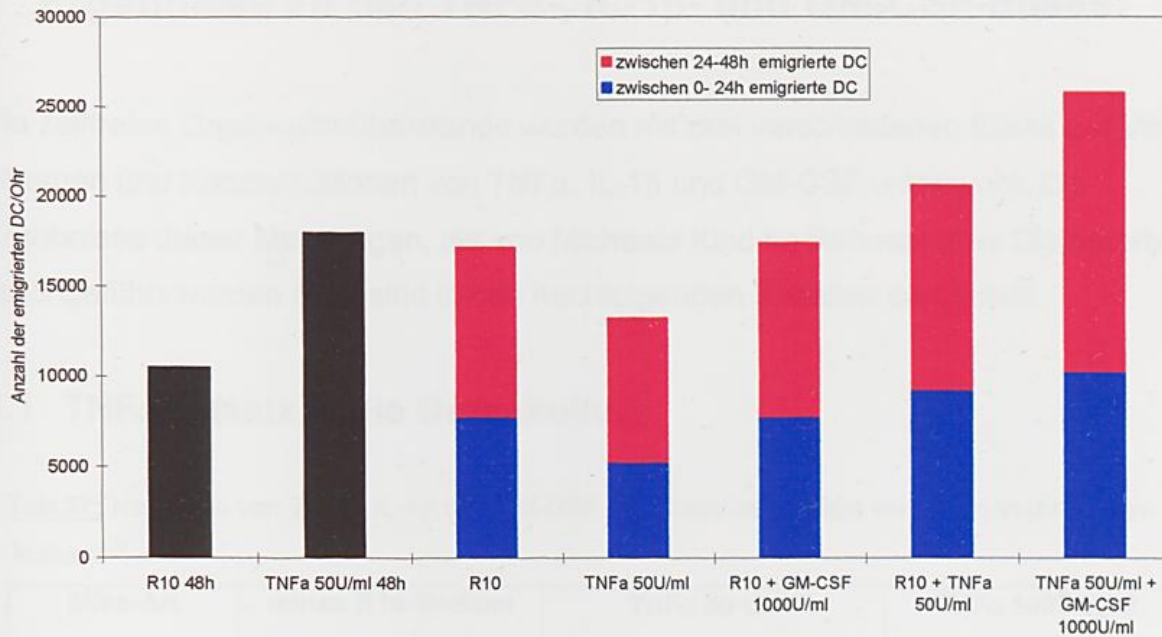


Abb. 33: Der Mediumwechsel nach 24h sowie die TNF α - und GM-CSF-Zusätze zu den bereits emigrierten dendritischen Zellen führen zu einer deutlichen Zellzahlerhöhung gegenüber der Kultur auf reinem Medium (Daten aus Tab. 26).

Durch den Mediumwechsel nach 24 Stunden kam es im Vergleich zur 48-stündigen Organkultur zu einer Zellzahlerhöhung. Der Zusatz von 50 U/ml TNF α zeigte bei einem Mediumwechsel Zellzahlerniedrigung, was aber als „Ausreißer“ zu interpretieren ist (D 11). GM-CSF- und TNF α -Zugabe zu den in den ersten 24h ausgewanderten dendritischen Zellen führte zu einer Steigerung der Zellzahl mindestens im gleichen Ausmaß wie der Mediumwechsel. Aus diesem Versuch kann man unter anderem auch schließen, daß von Tag 1 bis Tag 2 der Organkultur mehr dendritische Zellen auswandern als in den ersten 24 Stunden der Kultur (Tab. 26, Abb. 33), was durch die Experimente von Ortner bestätigt wird (47).

Zusammenfassend kann man zu diesen Experimenten sagen, daß GM-CSF in der Organkultur keinen wesentlichen Einfluß auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen hat, aber die Zellzahl geringfügig erhöhen kann. Die Zugabe von TNF α und GM-CSF zu bereits emigrierten dendritischen Zellen und ein Mediumwechsel nach 24 Stunden führte ebenfalls zu Zellzahlerhöhungen, aber es traten auch starke Schwankungen auf. Sowohl TNF α als auch GM-CSF können somit die Überlebensrate der in den ersten 24 Stunden ausgewanderten DC steigern bzw. die Reifung der kutanen dendritischen Zellen induzieren.

4 Ergebnisse zu den TNF α -, IL-1 β - und GM-CSF-Elisas:

Die zellfreien Organkulturüberstände wurden mit drei verschiedenen Elisas auf Vor- kommen und Konzentrationen von TNF α , IL-1 β und GM-CSF untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen, die von Michaela Kind im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt wurden (63), sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

4.1 TNF α -Zusatz in die Organkultur:

Tab.27: Nachweis von TNF α , IL-1 β und GM-CSF mit Elisas bei Zugabe von TNF α in die Organ- kultur

Elisa-Art	reines R10-Medium	TNF α 50 U/ml = 4 ng/ml	TNF α 5000 U/ml = 416 ng/ml
GM-CSF	213,9 pg $\pm$ 70,8 pg	258,9 pg $\pm$ 125,1 pg	382,7 pg $\pm$ 249,0 pg
IL-1 β	109,1 pg $\pm$ 54,2 pg ¹	118,5 pg $\pm$ 91,5 pg	96,7 pg $\pm$ 44,8 pg ²
TNF α	unter 31 pg	86,6 pg $\pm$ 32,1 pg	4 - 200 ng

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse in pg/ml bzw. ng/ml; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 8; IL-1 β : n = 8, ¹ ... 2 Messungen (M) unter 31 pg, ² ... 1 M unter 31 pg; TNF α : n = 11; Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Zytokine, die sich während der 48-stündigen Organkultur im Medium akkumulierten, wurden gemessen. Die Ergebnisse beim GM-CSF-Elisa deuteten auf eine Zunahme an GM-CSF in den Kulturüberständen mit steigender TNF α -Konzentration hin. Daraus kann man auf eine Induktion der GM-CSF-Produktion durch TNF α schließen. Bei IL-1 β schwankten die Werte bei steigender Menge an zugegebenem TNF α in die Organkultur um ungefähr den gleichen Wert (100 pg/ml), was darauf hindeutet, daß TNF α die Produktion bzw. den Verbrauch von IL-1 β nicht beeinflusst. Im TNF α -Elisa waren wie erwartet zunehmende TNF α -Mengen nachweisbar, aber nicht in den Konzentrationen, die in die Kultur gegeben worden waren (4 und 416 ng/ml). Dies ist wahrscheinlich auf einen starken Verbrauch an TNF α oder Probleme beim Nachweis des exogenen TNF α zurückzuführen.

4.2 IL-1β-Zusatz in der Organkultur:

Tab. 28: GM-CSF-, TNFα- und IL-1β-Nachweis mit Elisass bei Zugabe von IL-1β in die Organkultur

Elisa-Art	reines R10-Medium	IL-1β 2800 - 3000 U/ml = 280 - 300 ng/ml
GM-CSF	147,9 pg ± 32,7 pg	242,4 pg ± 84,0 pg
IL-1β	136,4 pg ± 91,5 pg ¹	1 - 323 ng
TNFα	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse in pg/ml und ng/ml; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 2; IL-1β: n = 6, ¹ ... 1 M unter 31 pg; TNFα: n = 4, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Wie bei der Zugabe von TNFα ins Medium erhöhte sich auch hier die Menge an GM-CSF, wenn IL-1β in die Organkultur zugegeben wurde. Das läßt vermuten, daß die vermehrte GM-CSF-Produktion sowohl durch TNFα als auch durch IL-1β induzierbar ist. IL-1β war annähernd in den eingesetzten Mengen nachweisbar. Im Gegensatz dazu war TNFα weder in der Kultur mit reinem Medium noch bei IL-1β-Zugabe meßbar.

4.3 GM-CSF-Zusatz in die Organkultur:

Tab.29: GM-CSF-, TNFα- und IL-1β-Nachweis mit Elisass bei Zugabe von GM-CSF in die Organkultur

Elisa-Art	R10	GM-CSF 2000 U/ml =105 ng/ml	GM-CSF 5000 U/ml =263 ng/ml
GM-CSF	165,2 pg ± 81,2 pg	400 pg - 9,8 ng	490 pg - 10,6 ng
IL-1β	56,2 pg	unter 31 pg	-
TNFα	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse oder einmalige Messungen; GM-CSF: n = 6; IL-1β und TNFα: n = 1, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Bei diesen Messungen waren die eingesetzten Mengen an GM-CSF nicht detektierbar, was möglicherweise für einen hohen Verbrauch an GM-CSF spricht. IL-1β und TNFα waren nicht nachweisbar, wobei bei beiden Zytokinen nur jeweils eine Messung durchgeführt worden war.

4.4 Lipopolysaccharide als Stimulator in der Organkultur:

Tab.30: GM-CSF-, TNF α - und IL-1 β -Nachweis mit Elisas bei Zugabe von LPS in die Organkultur

Elisa-Art	R10	LPS 10 ng/ml	LPS 100ng/ml	LPS 1 μ g/ml
GM-CSF	276 pg $\pm$ 74,7 pg	293,5 pg $\pm$ 102,5 pg	287,2 pg $\pm$ 106,3 pg	321,0 pg $\pm$ 122,0 pg
IL-1 β	127,7 pg $\pm$ 27,1 pg ¹	143,3 pg $\pm$ 49,3 pg	158,6 pg $\pm$ 57,4 pg ¹	135,0 pg $\pm$ 101,1 pg
TNF α	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg	unter 31 pg

Legende: Werte sind Mittelwerte der Meßergebnisse; Anzahl der Messungen: GM-CSF: n = 4; IL-1 β : n = 3, ¹ ... 1 M unter 31 pg; TNF α : n = 3, Nachweisgrenze lag bei 31 pg/ml.

Auch hier war eine leichte, aber nicht so eindeutige GM-CSF-Zunahme bei steigender LPS-Konzentration zu beobachten. Bei den IL-1 β -Messungen war ebenfalls eine Zunahme der Menge zu erkennen, aber die Werte lagen sehr eng beieinander. Die TNF α -Konzentrationen befanden sich wieder unterhalb der Nachweisgrenze.

5 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen:

5.1 Nachweis von zwei DC-Markern (In-1, 2A1) auf LC und dermalen dendritischen Zellen *in situ* und *in vitro*:

Wie unter B 3.4, 3.5, 3.6 und 3.7 beschrieben, können Langerhanszellen in Suspension und in der Ohrhaut mit Hilfe von MHC-Klasse II identifiziert und zusätzlich auf andere Marker untersucht werden. Dazu wurden in dieser Versuchsreihe zwei Marker für dendritische Zellen verwendet. Der erste Antikörper (In-1) kann an die invariante Kette, ein Molekül, das bei der Produktion von MHC-Klasse-II-Molekülen benötigt wird, binden (55). Der zweite Antikörper (2A1) dient zum Nachweis eines noch unbekannten Moleküls, das als Reifungsmarker gilt (53). Die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenz- Doppelfärbungen wurden in nachstehender Tabelle 31 aufgelistet und in einigen Fotos dargestellt (Abb. 34-37).

Tab. 31: Übersicht über das Vorkommen von In-1 und 2A1 auf Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen *in situ* und *in vitro*

	MHC II (2G9-FITC)	In-1	2A1
unkultivierte Epidermis	+	++	-
kultivierte Epidermis (R10, 48h)	+++	+	+
unkultivierte Dermis	+++	+	+
kultivierte Dermis (R10,48h)	+++	+	+
unkultivierte EC-Suspension	+	+	-
kultivierte EC-Suspension (72h)	+++	+	+
emigrierte kutane DC (R10, 48h)	+++	+	+

Eine Färbung der invarianten Kette konnte mit dem Antikörper (In-1) in allen frisch präparierten und kultivierten Hautproben durch Bindung an Langerhanszellen der Epidermis und an dermale dendritische Zellen beobachtet werden. Die deutlichste Färbung war auf der frischen, unkultivierten Epidermis zu sehen, da hier die Expression der invarianten Kette bei unreifen, prozessierenden dendritischen Zellen am größten ist (Abb. 34a,b). In den unkultivierten EC-Suspensionen waren die aus der Haut isolierten Langerhanszellen und die reifen dendritischen Zellen nach Kultivierung, die scheinbar noch Restmoleküle von invarianter Kette besaßen oder teilweise noch nicht ausgereift waren, mit In-1 nachweisbar. Auch in den Organkulturüberständen konnten mit diesem Antikörper die emigrierten kutanen dendritischen Zellen, die ebenfalls restliche Moleküle der invarianten Kette aufwiesen, sichtbar gemacht werden.

Der Reifungsmarker 2A1 war in der kultivierten Epidermis erwartungsgemäß nur noch auf einigen wenigen LC, die reifenden, auswandernden Langerhanszellen entsprachen, exprimiert. In kultivierten EC-Suspensionen und in den Organkulturüberständen konnte dieser Antikörper an reife dendritische Zellen binden (Abb. 35a,b). Einige Zellen in der unkultivierten Dermis wiesen ebenfalls diesen Marker auf – möglicherweise dermale dendritische Zellen.

Die Auswanderung von reifenden und bereits gereiften Langerhanszellen war deutlich erkennbar, da in den *cords* der kultivierten Dermis MHC-Klasse-II-positive Zellen, die noch In-1 oder den Reifungsmarker 2A1 exprimierten, zu sehen waren (Abb. 36, 37).

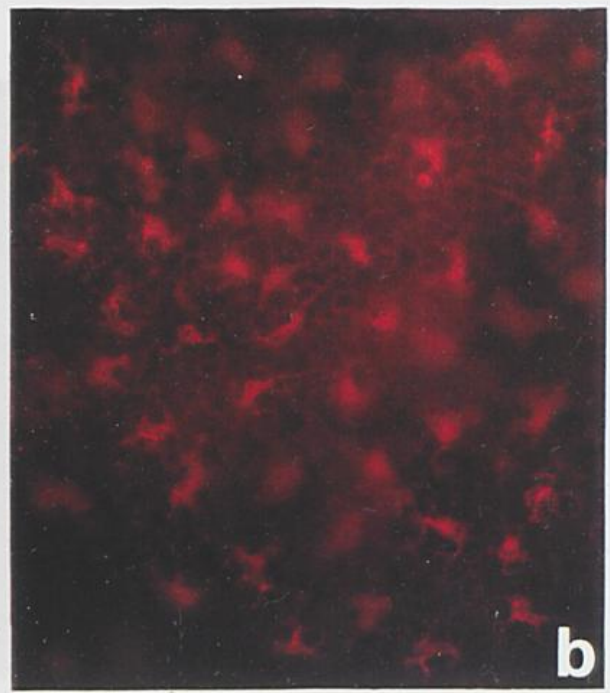
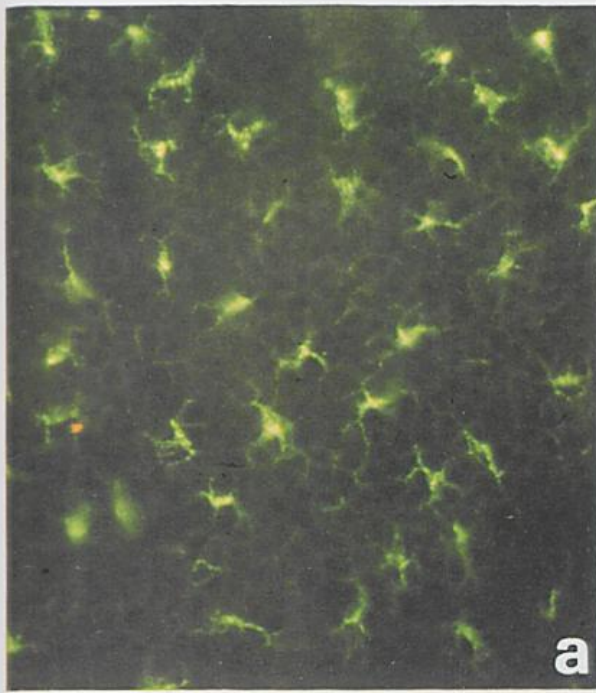


Abb.34: unkultivierte Epidermis, a: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50), b: Immunfluoreszenzfärbung gegen In-1 (unverdünnter supernatant); netzartige Verteilung der LC, deutliche In-1-Expression der LC sichtbar; 350-fache Vergrößerung.

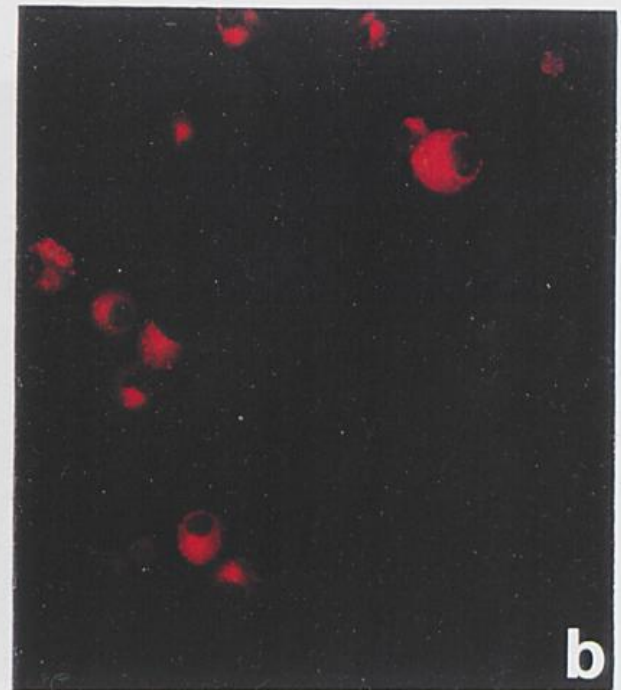
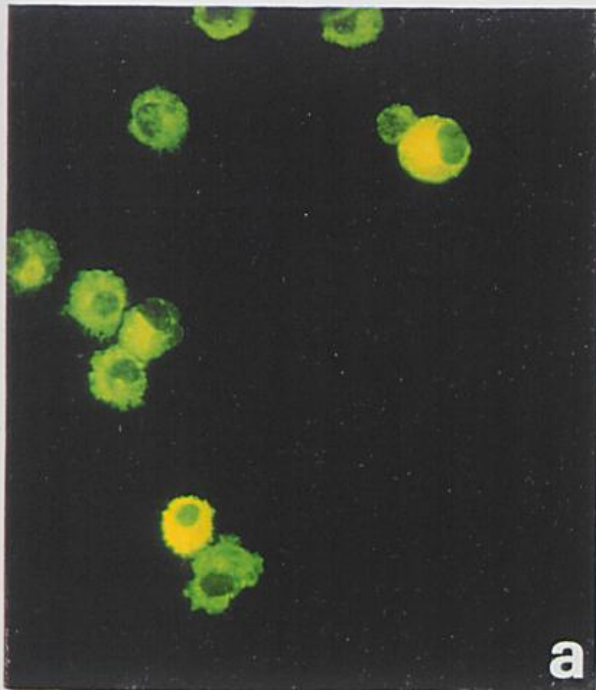


Abb. 35: 72 Stunden kultivierte EC-Suspension; a: Immunfluoreszenzfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50), b: Immunfluoreszenzfärbung gegen 2A1 (unv. supernatant); die stark MHC-Klasse-II-positiven DC exprimieren viel 2A1; 350-fache Vergrößerung.

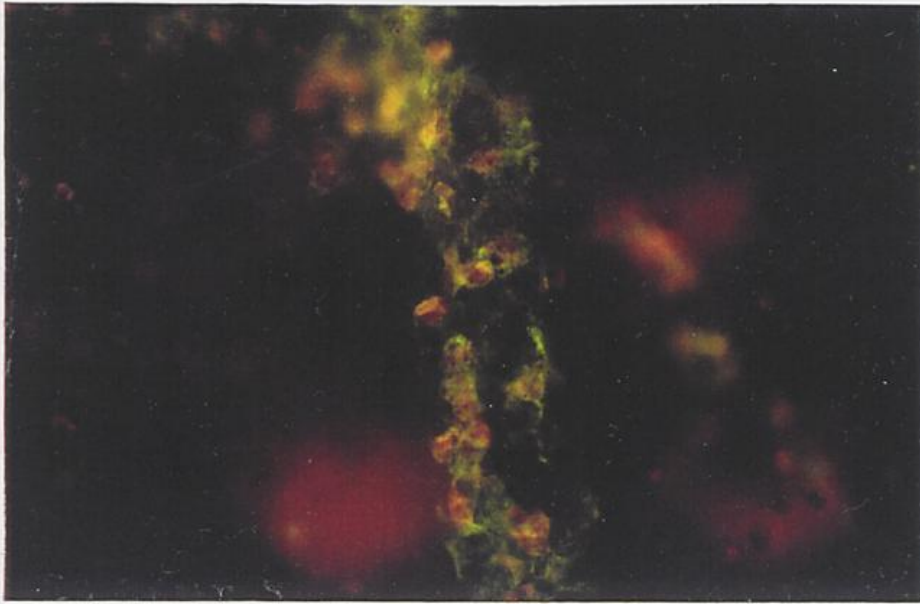


Abb. 36: 48 Stunden auf reinem R10-Medium kultivierte Dermis, Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50) und In-1 (unv. supernatant); in den cords sind emigrierende LC sichtbar, die noch teilweise In-1 exprimieren; 350-fache Vergrößerung.

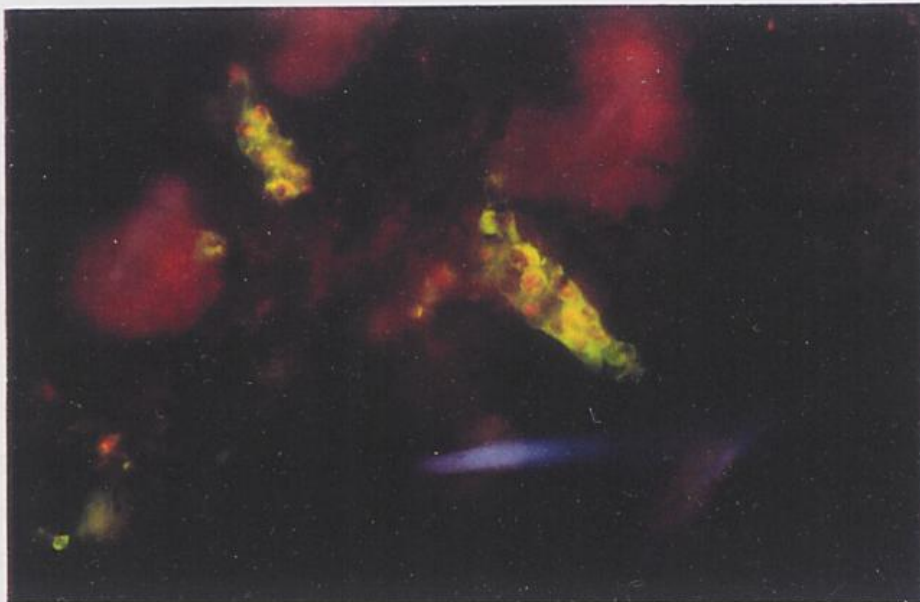


Abb. 37: 48 Stunden auf reinem R10-Medium kultivierte Dermis, Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen MHC-Klasse II (2G9-FITC, 1:50) und 2A1 (unv. supernatant); in den cords sind emigrierende LC sichtbar, die schon den Reifungsmarker 2A1 exprimieren; 350-fache Vergrößerung.

6 Morphologische Untersuchungen der kutanen dendritischen Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie:

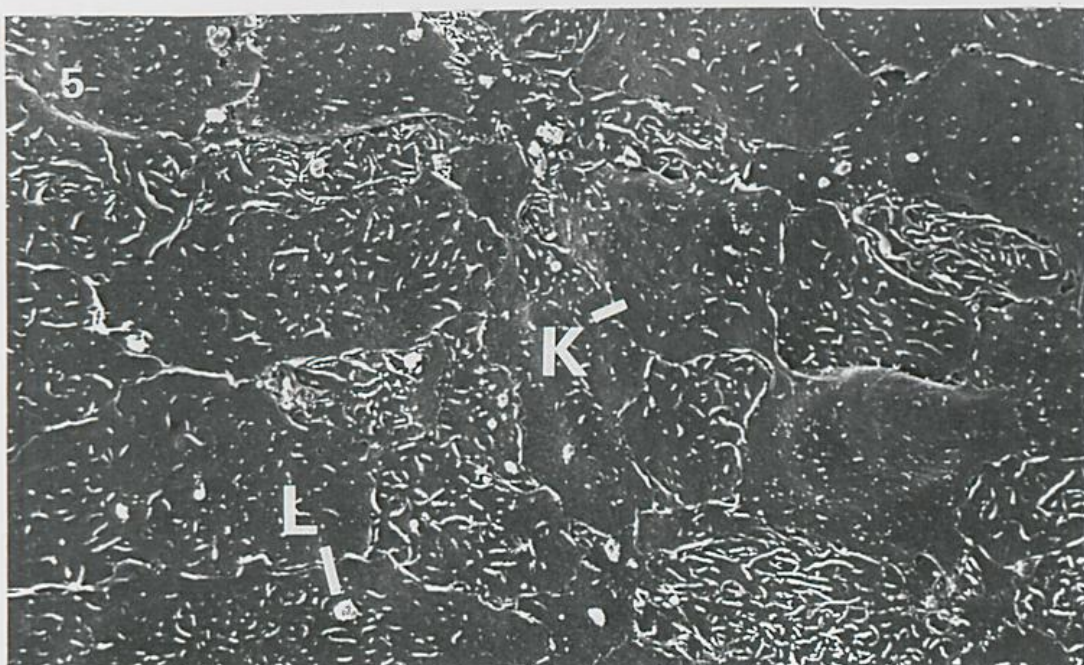
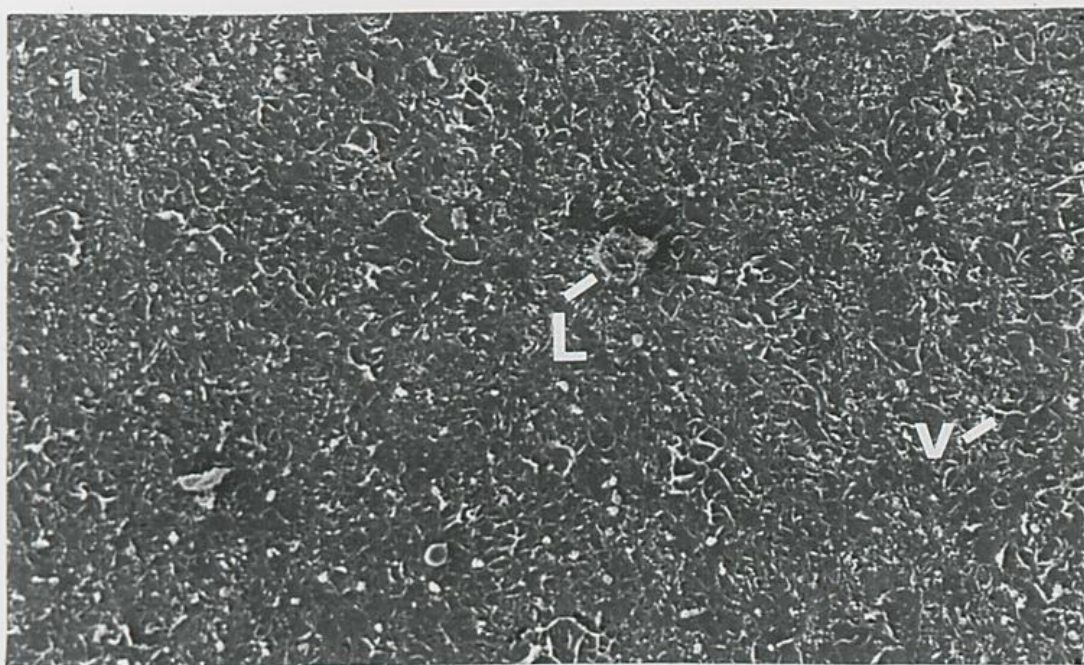
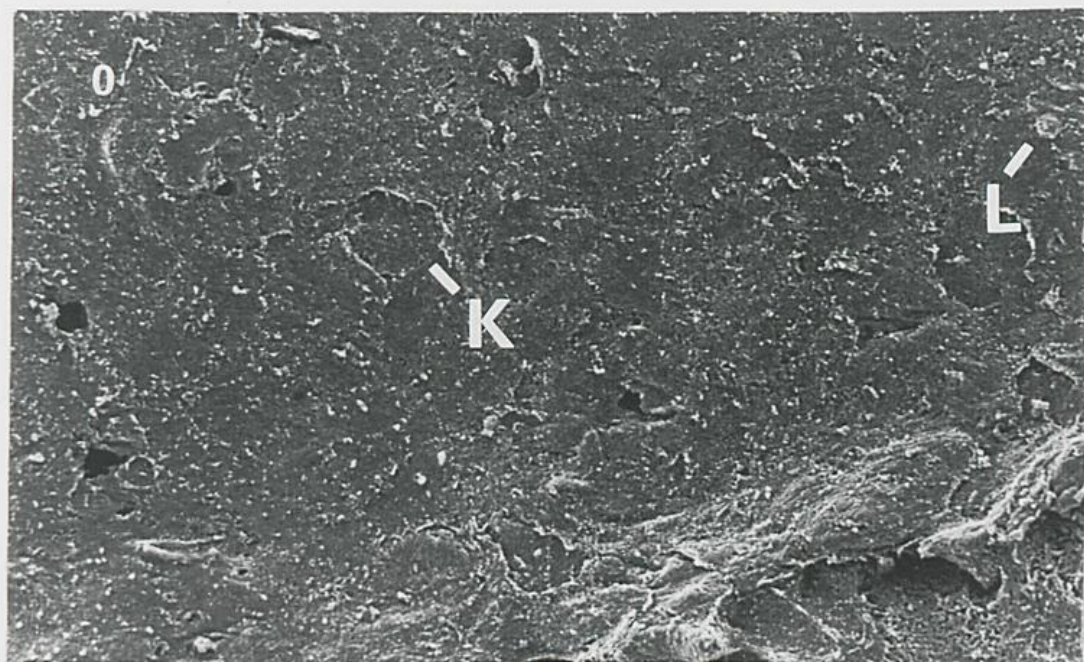
In Zusammenarbeit mit Univ.-Doz. Dr. K. Pfaller vom Institut für Histologie und Embryologie der Universität Innsbruck wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von kutanen dendritischen Zellen durchgeführt.

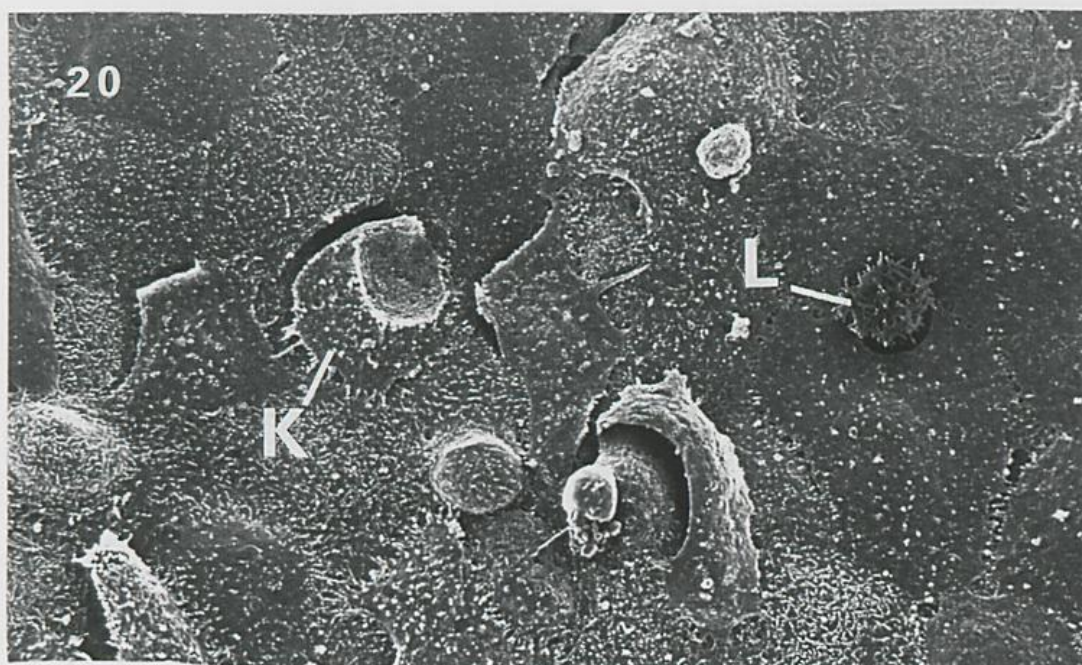
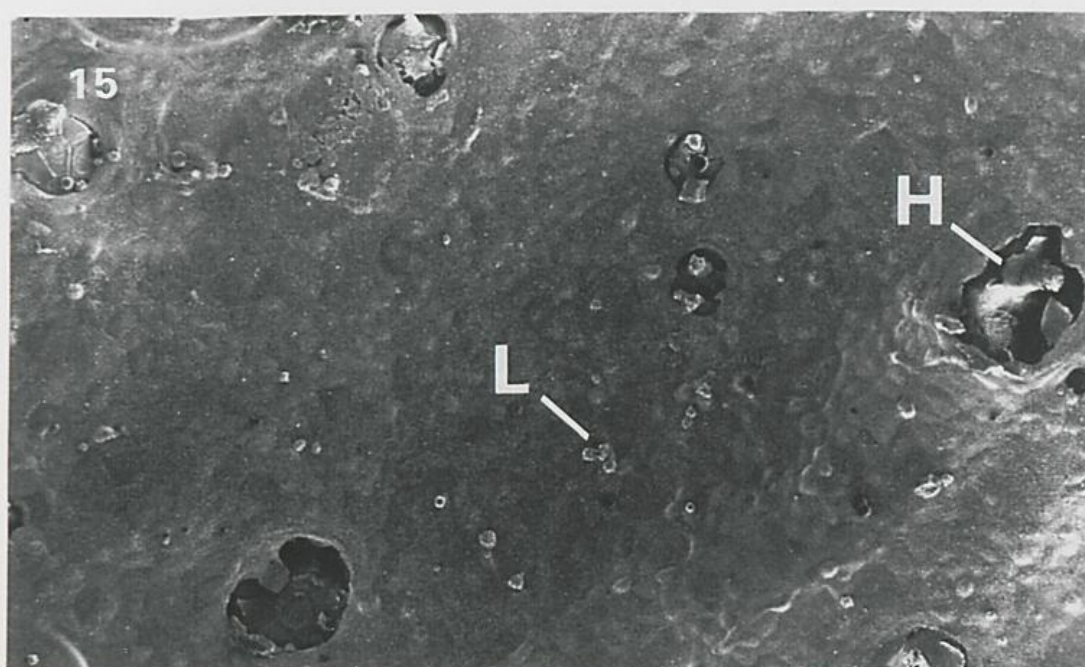
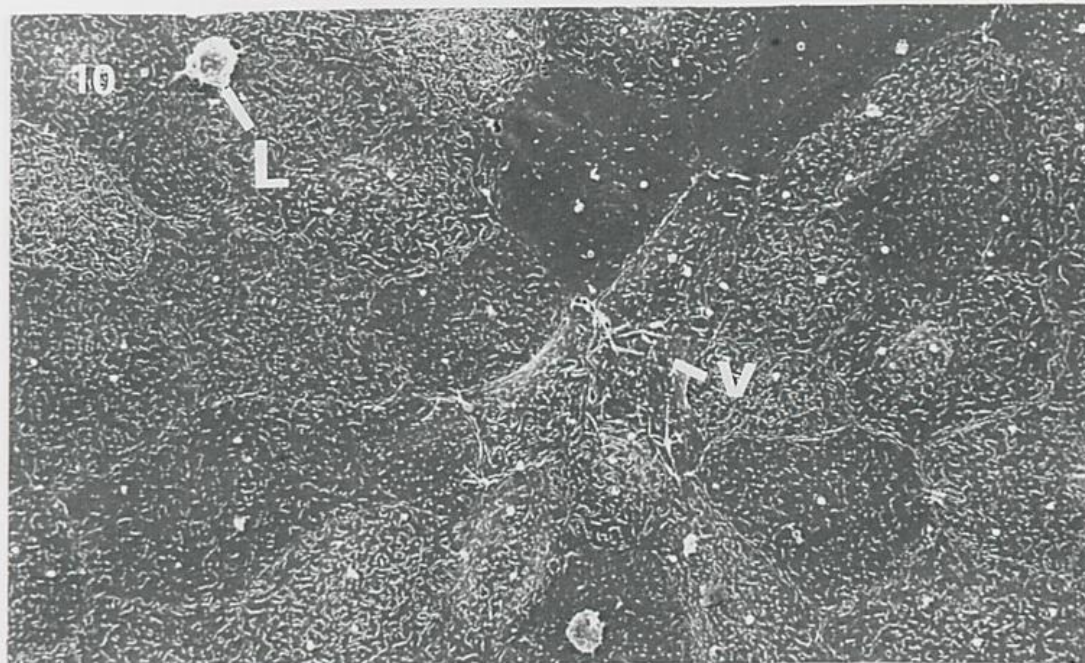
6.1 Untersuchung der Epidermis und Dermis:

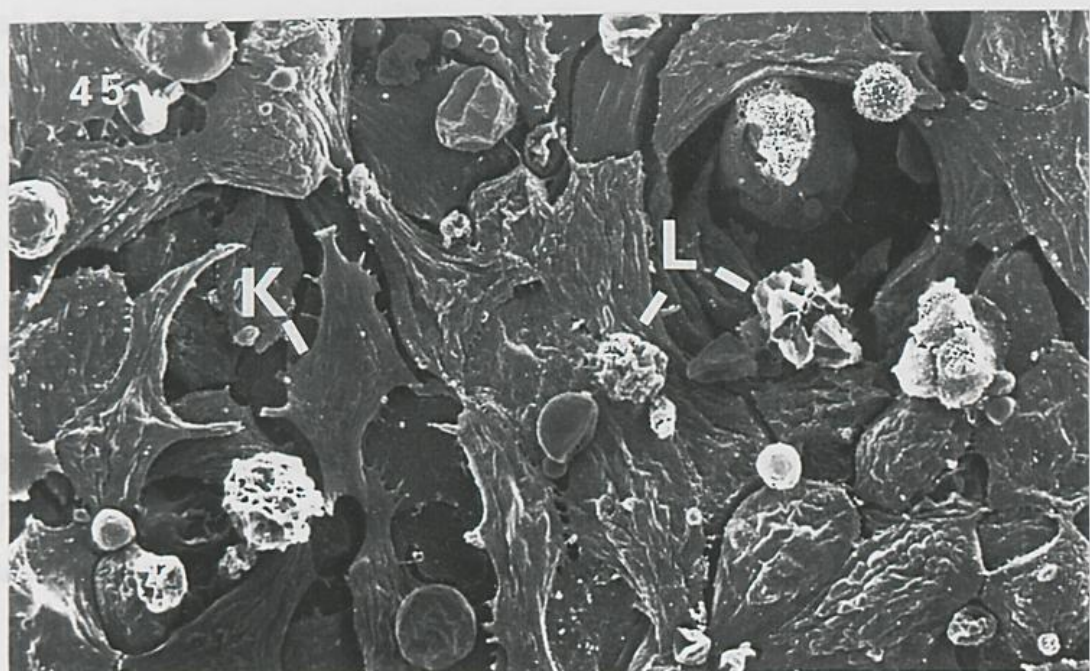
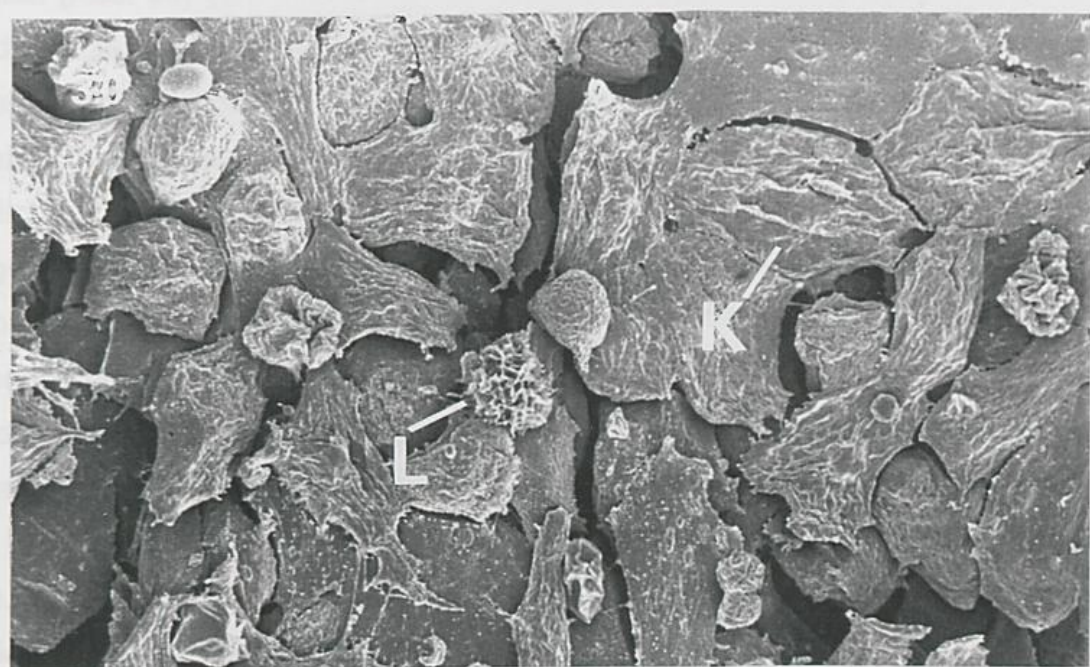
6.1.1 Kultur von Epidermis:

Um die Auswanderung der Langerhanszellen *in situ* zu beobachten, wurden kleine Epidermisstücke entweder frisch oder nach verschieden langer Kultivierung (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 h) genommen, wie unter B 3.10.1 beschrieben fixiert und präpariert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von der zur Dermis gewandten Seite der Epidermis angefertigt, wo die Langerhanszellen aus der Epidermis kommend in die Dermis und dort wahrscheinlich in die Lymphbahnen einwandern. Das Ziel dieses Zeitverlaufes war es, auswandernde Langerhanszellen zu sehen, die Stellen der Emigration zu erkennen und Unterschiede in der Anzahl der Langerhanszellen im Laufe der Kultur festzustellen. Die Ergebnisse sind in den nächsten Fotos dargestellt (Abb. 38). Bei der gewählten Art der Trennung von Epidermis und Dermis (60) wird die kollagenöse *Lamina densa* von der Epidermis entfernt. Man blickt also direkt auf die basalen Keratinozyten.

Abb. 38: (Seite 84ff.) Zeitverlauf einer 45-stündigen Kultur von Epidermis (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 Stunden), dargestellt in den folgenden Fotos; die Zahl an emigrierenden Langerhanszellen nimmt im Verlauf der Kultur zu, der Epithelverband zerfällt nach 25h; H ... Haaröffnung, L ... Langerhanszelle, K ... Keratinozyt, v ... villi; 0, 1, 10, 20, 25, 30, 45 Stunden-Fotos 2600-fache Vergrößerung; 5 Stunden 5200-fache Vergrößerung; 15 Stunden 390-fache Vergrößerung; LC ungefähr 10µm im Durchmesser.







Zum Zeitpunkt 0, der einer frisch präparierten Epidermis entspricht, war der deutlich strukturierte Aufbau des Epithels zu erkennen. Die Epithelzellen wiesen viele *villi* auf, mit denen sie sich *in situ* in der Basallamina und dem Bindegewebe der Dermis festhaken. Es waren keine emigrierenden Langerhanszellen eindeutig zu sehen, aber vermutlich zeigten sich erste Fortsätze dieser Zellen, die zwischen den Epithelzellen hervorragten (Abb. 38; 0).

Nach einstündiger Kultur der Epidermis auf reinem R10-Medium war das Erscheinungsbild des Epithels unverändert, jedoch waren schon erste wenige Langerhanszellen, die zwischen den Epithelzellen an Zellgrenzen auswanderten, sichtbar (Abb. 38; 1).

Bei den Kulturen über fünf und zehn Stunden entsprach das Bild der Epidermis dem der einstündigen Probe (Abb. 38; 5, 10).

Ab einer Kultivierung der Hautproben von 15 Stunden waren Langerhanszellen mit deutlichen *veils* erkennbar, jedoch stieg die Zahl der auswandernden Langerhanszellen erst nach einer 20-stündigen Kultur eindeutig an. Bis zu diesem Zeitpunkt waren auf der Epitheloberfläche *villi* zu sehen, die aber immer kürzer und seltener wurden (Abb. 38; 15, 20).

Auf der Epidermis, die 25 Stunden inkubiert worden war, konnte man erkennen, daß langsam ein Zerfall des Epithels begann und die *villi* völlig verschwunden waren. Die Zahl der Langerhanszellen mit schön ausgebildeten *veils* nahm beständig zu (Abb. 38; 25).

Die letzten zwei Proben (Abb. 38; 30, 45) zeigten einen immer stärker werdenden Zerfall des Epithels, sodaß richtige Spalten zwischen den Zellen entstanden, in denen die Langerhanszellen vermehrt hervorkamen. Die Oberfläche der Epithelzellen war vollkommen glatt, da keine *villi* mehr zu erkennen waren. Zusätzlich lösten sich bereits einige Keratinozyten von der Epidermis, weshalb die emigrierenden Langerhanszellen nicht mehr so deutlich zu identifizieren waren.

Zusammenfassung:

Anhand dieser Bilder kann man feststellen, daß durch Zerfall des Epithels nach bereits 25-stündiger Organkultur die Langerhanszellen möglicherweise eher passiv ins Medium gelangen. Daher sollte die 48-stündige Inkubationszeit bei der Kultur von Epidermis alleine nicht überschritten werden. Die Emigration der Langer-

hanszellen beginnt sehr bald nach Beginn der Organkultur, wobei diese Zellen bereits vor dem Tod der Maus zur Wanderung stimuliert worden sein könnten. Eine massive Auswanderung der Langerhanszellen war ab 15 bis 20 Stunden Kultivierung auf der Epidermisunterseite und im Medium erkennbar, und die Zahl der emigrierenden Langerhanszellen nahm im Verlauf der weiteren Organkultur beständig zu.

6.1.2 Kultur von Ohrhaut:

Zur Untersuchung der Emigration in kompletter Haut wurden Mäuseohren über 48 Stunden kultiviert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Das entspricht dem System, das in den Auswanderungsstudien verwendet wurde. Die Betrachtung der Unterseite der Dermis sollte Aufschluß über die Wanderung der Langerhanszellen in der Dermis und über den Verlauf der *cords* geben.

Wie aus den nachfolgenden Fotos (Abb. 39-41) ersichtlich ist, waren zahlreiche emigrierende kutane dendritische Zellen zwischen den Fibrozyten und dem dichten Bindegewebsgeflecht sichtbar. Es war keine Konzentrierung der Zellen an bestimmten Stellen (Lymphbahnöffnungen) zu sehen, sondern eine relativ zufällige Verteilung. Das deutet auf eine Wanderung der kutanen dendritischen Zellen nicht nur in den Lymphbahnen, sondern auch diffus durch das Bindegewebe der Dermis hin.

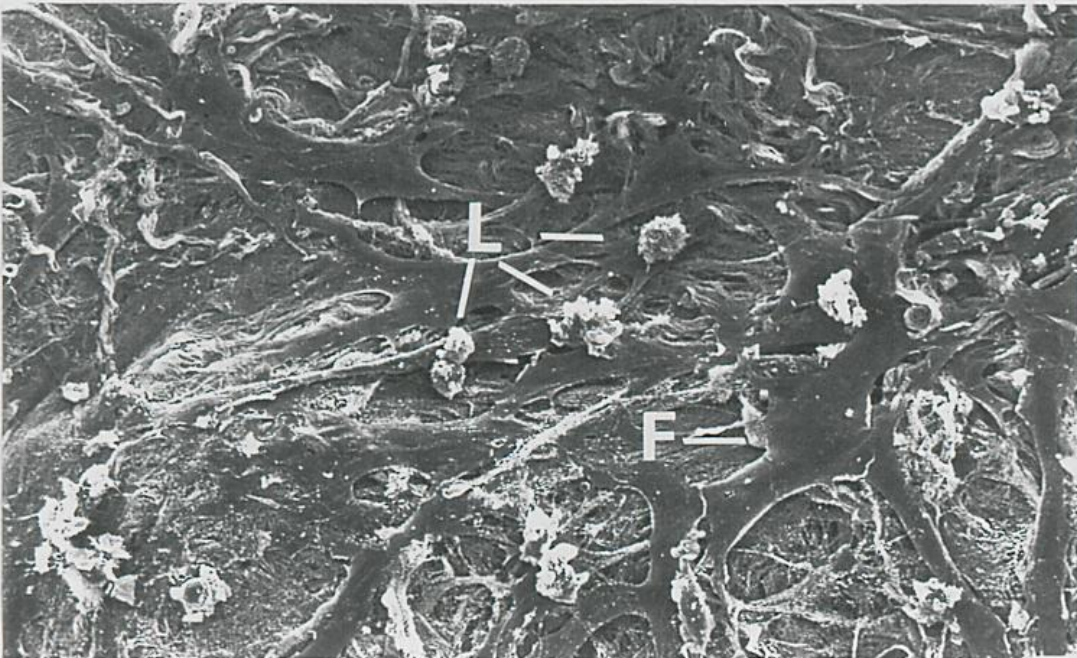


Abb.39: 48h-kultivierte Ohrhaut von der Unterseite der Dermis fotografiert; es sind emigrierende Langerhanszellen (L) zwischen den Fibrozyten (F) und dem Bindegewebsgeflecht (B) sichtbar; 1300-fache Vergrößerung.

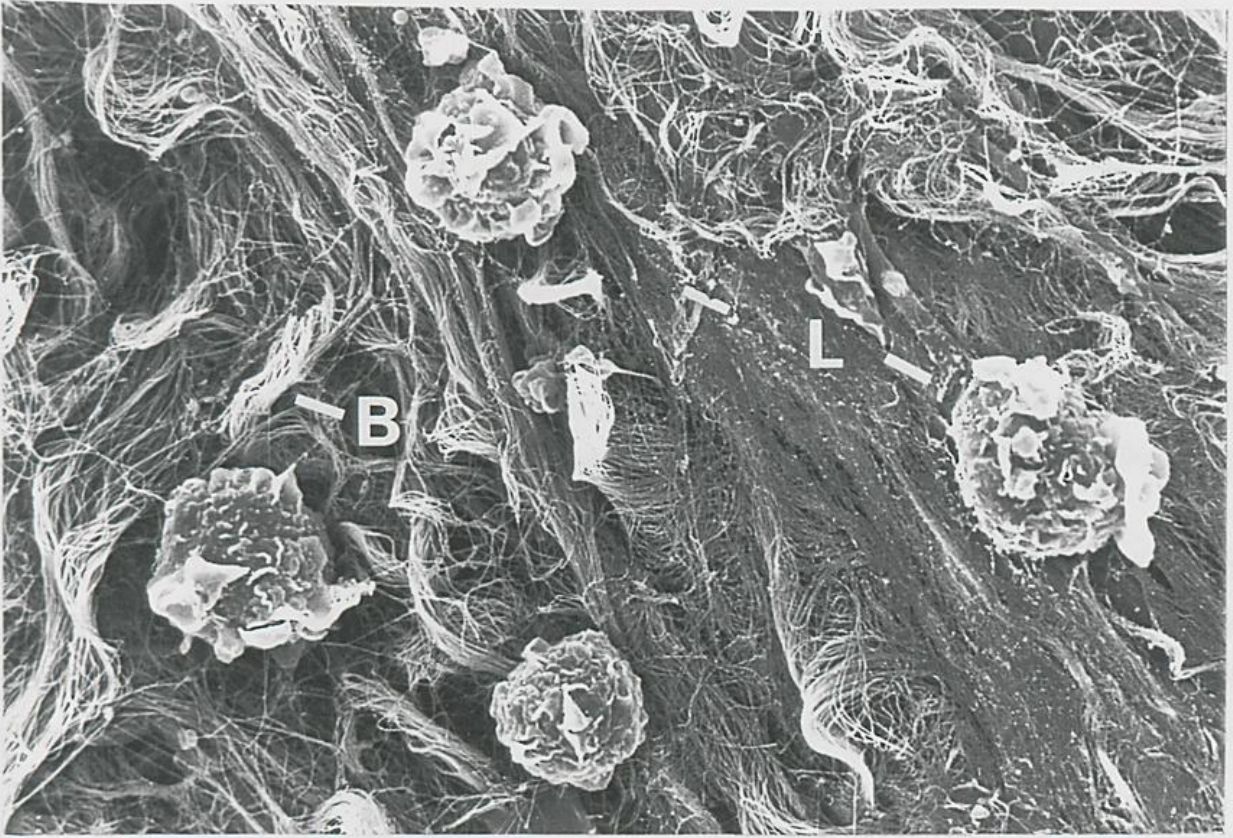


Abb. 40: 48h-kultivierte Ohrhaut von der Unterseite der Dermis fotografiert; es sind emigrierende Langerhanszellen (L) zwischen den Bindegewebsfasern (B) sichtbar; 5460-fache Vergrößerung.

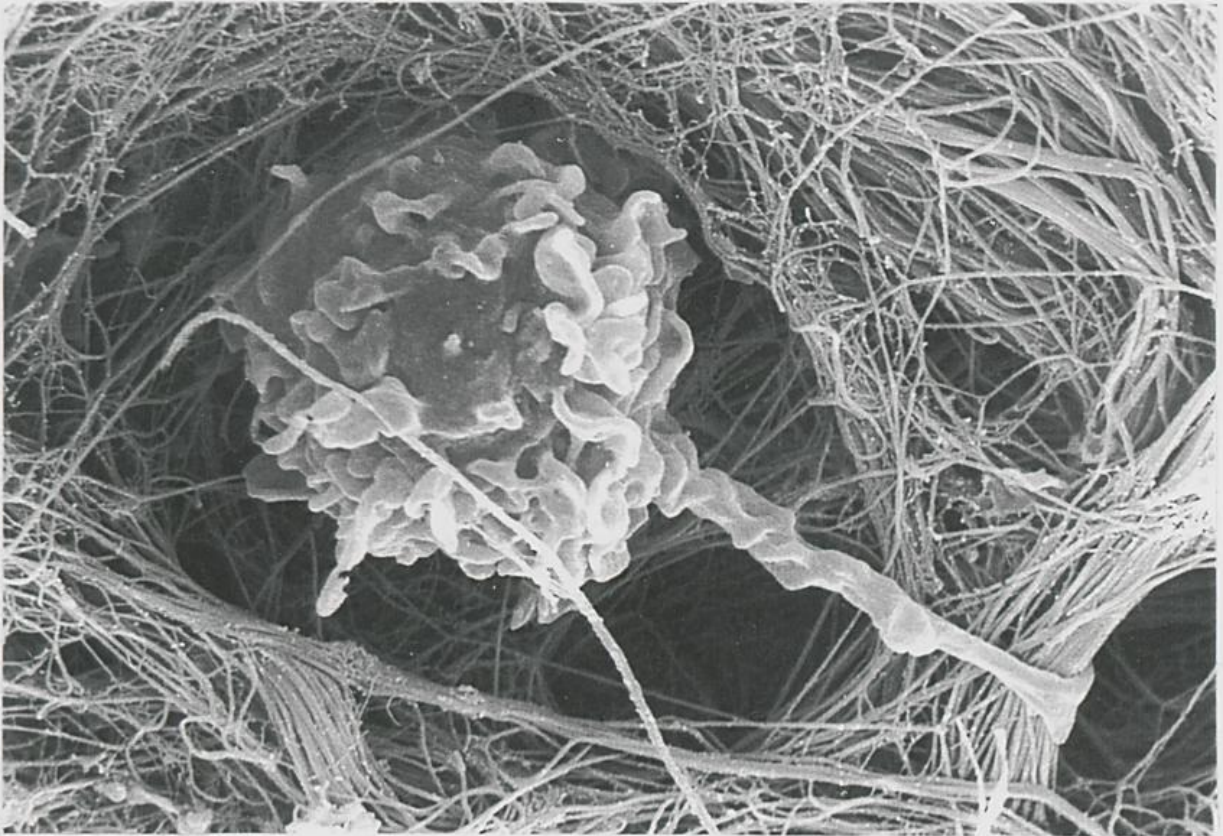


Abb. 41: Langerhanszelle, die sich mit den Ausläufern an Bindegewebsfasern aus der Dermis rauszieht; 24050 -fache Vergrößerung.

6.2 Untersuchung der aus der Epidermis und Dermis in 24 bzw. 48 Stunden emigrierten dendritischen Zellen und der in EC-Suspensionen gereiften Langerhanszellen:

Die kutanen dendritischen Zellen, die in 24 Stunden und in 48 Stunden aus der Epidermis und der Dermis auswandern, wurden getrennt im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Dabei zeigten sich kleine Unterschiede in der Ausbildung der Zytoplasmafortsätze bei den in 24 Stunden ausgewanderten Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen. Bei den in 48 Stunden emigrierten Zellen epidermalen und dermalen Ursprungs waren keine Unterschiede mehr zu sehen. Beide Zelltypen hatten deutliche *veils* ausgebildet (Abb. 42-45).

Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermalen Zellsuspensionen kultiviert worden waren, wurden mit den emigrierten Zellen aus der Epidermis verglichen. Es waren keine Unterschiede zwischen den *in situ* und *in vitro* gereiften Langerhanszellen zu erkennen (Abb. 46, 47).

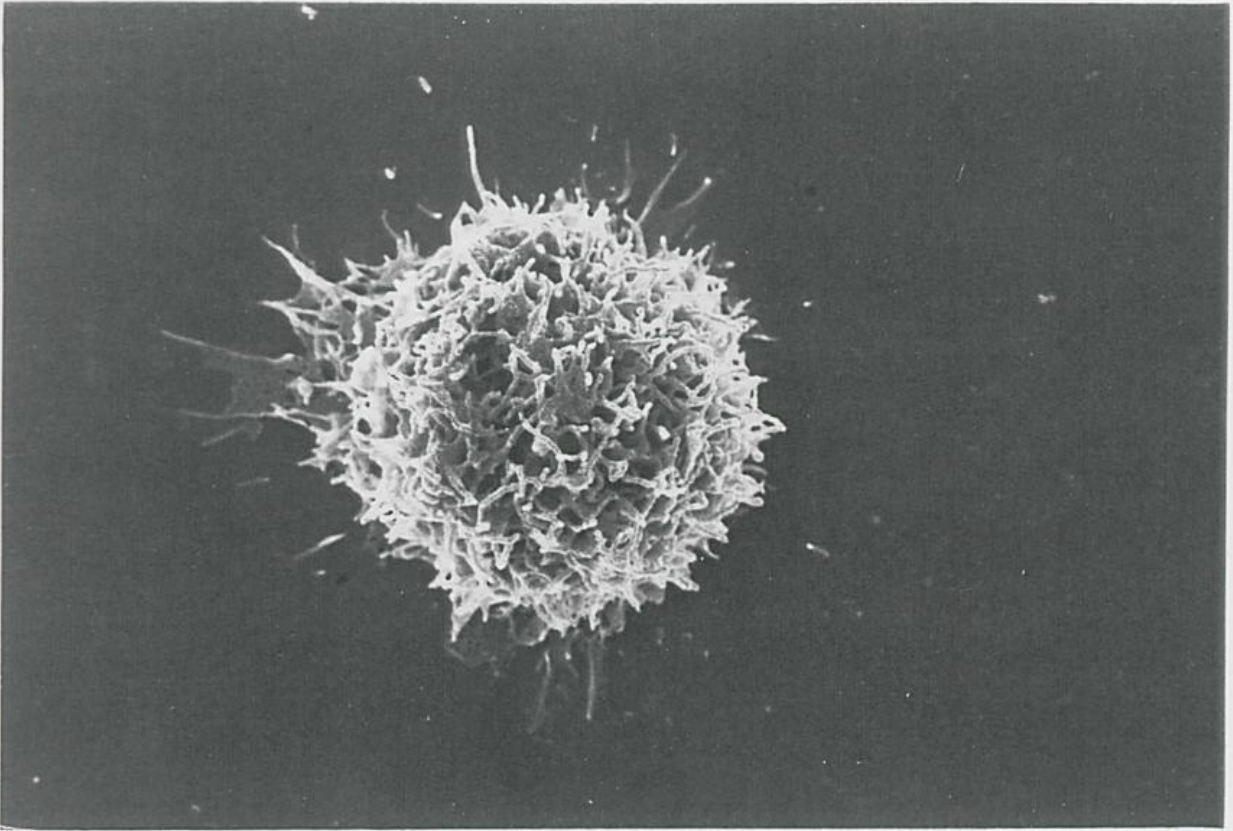


Abb. 42: Langerhanszelle mit Zytoplasmafortsätzen, aber noch nicht deutlich ausgeprägten *veils*, die in 24 Stunden aus der Epidermis ausgewandert ist; 13000-fache Vergrößerung.

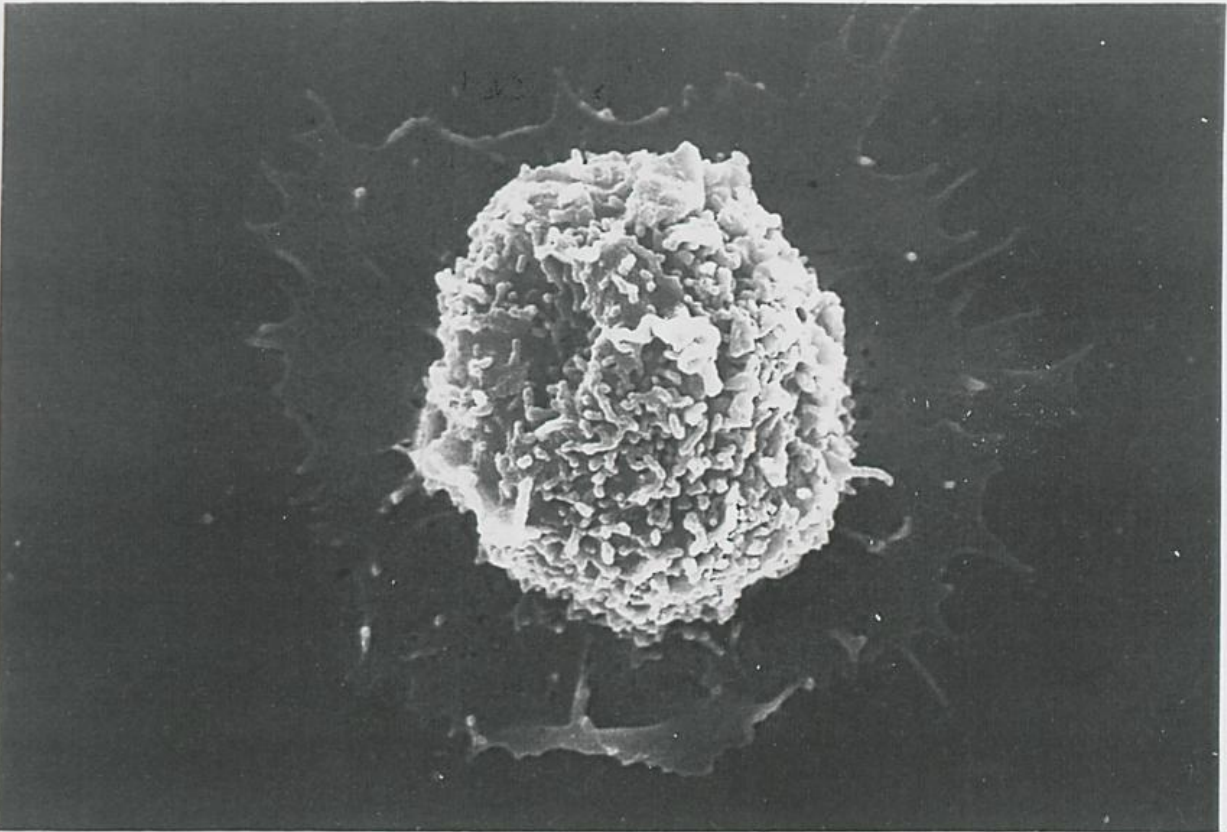


Abb. 43: Dermale dendritische Zelle mit Ansätzen von *veils*, die in 24 Stunden aus der Dermis ausgewandert ist und sich im Aussehen leicht von der Langerhanszelle unterscheidet; 20800-fache Vergrößerung.

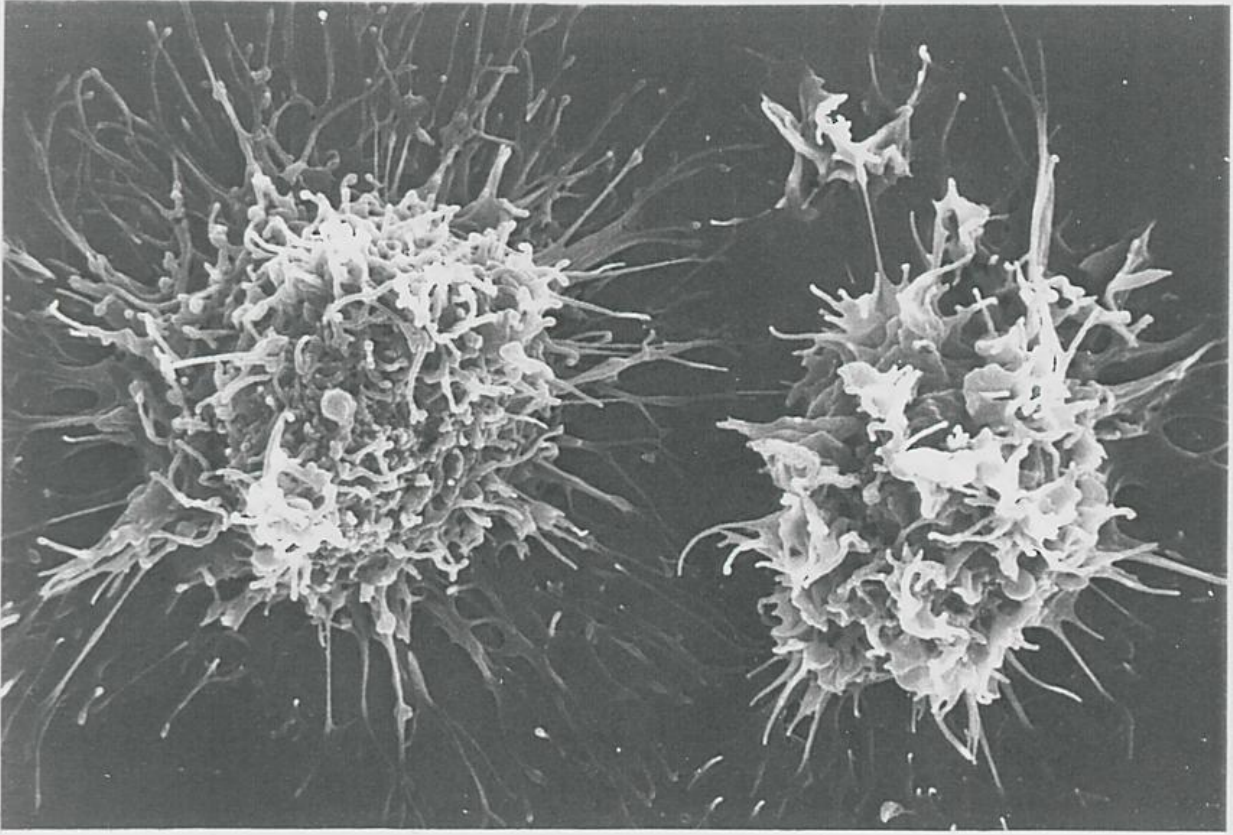


Abb. 44: Langerhanszellen mit deutlich sichtbaren *veils*, die in 48 Stunden aus der Epidermis ausgewandert sind; 12480-fache Vergrößerung.

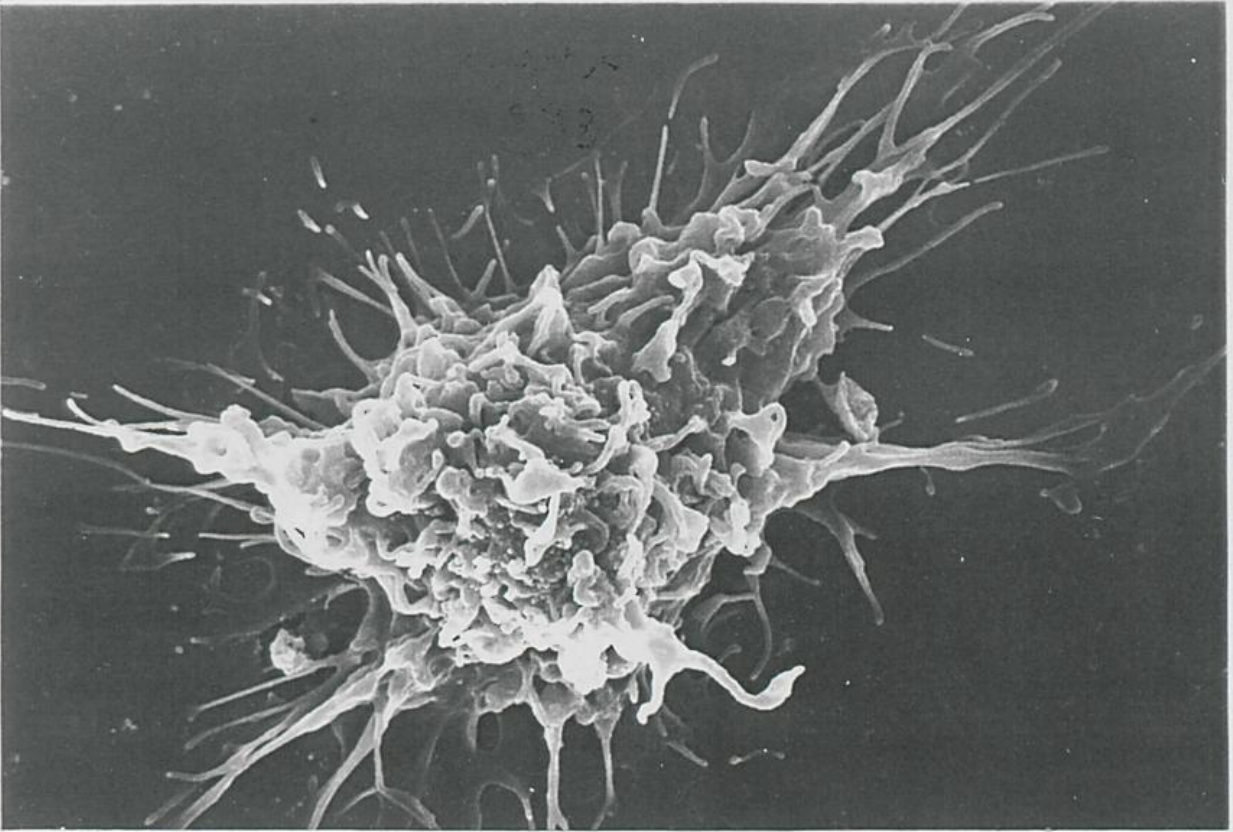


Abb. 45: Dermale dendritische Zelle mit deutlich ausgeprägten *veils*, die in 48 Stunden aus der Dermis ausgewandert ist und sich nicht mehr von der Langerhanszelle oben unterscheidet; 18200-fache Vergrößerung.

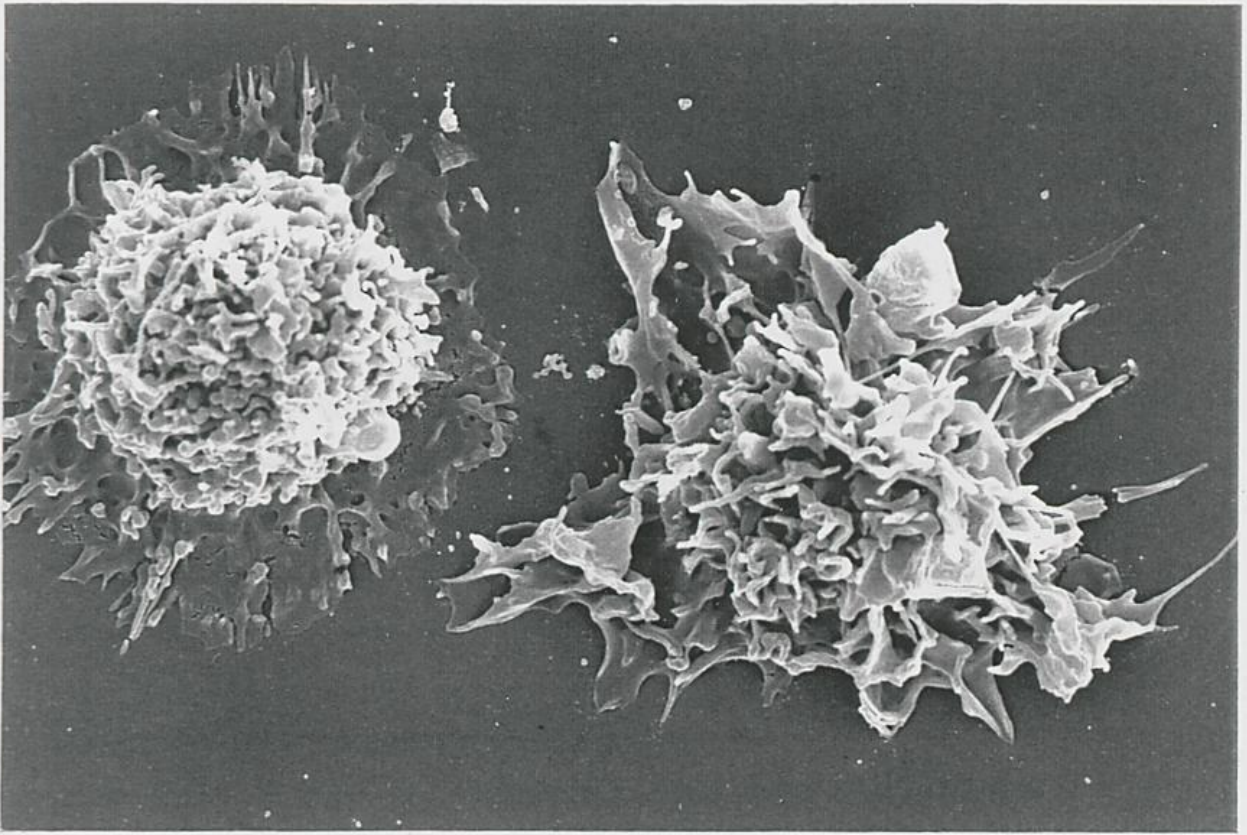


Abb. 46: Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermaler Zellsuspension kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht von *in situ* gereiften Langerhanszellen; 9720-fache Vergrößerung.

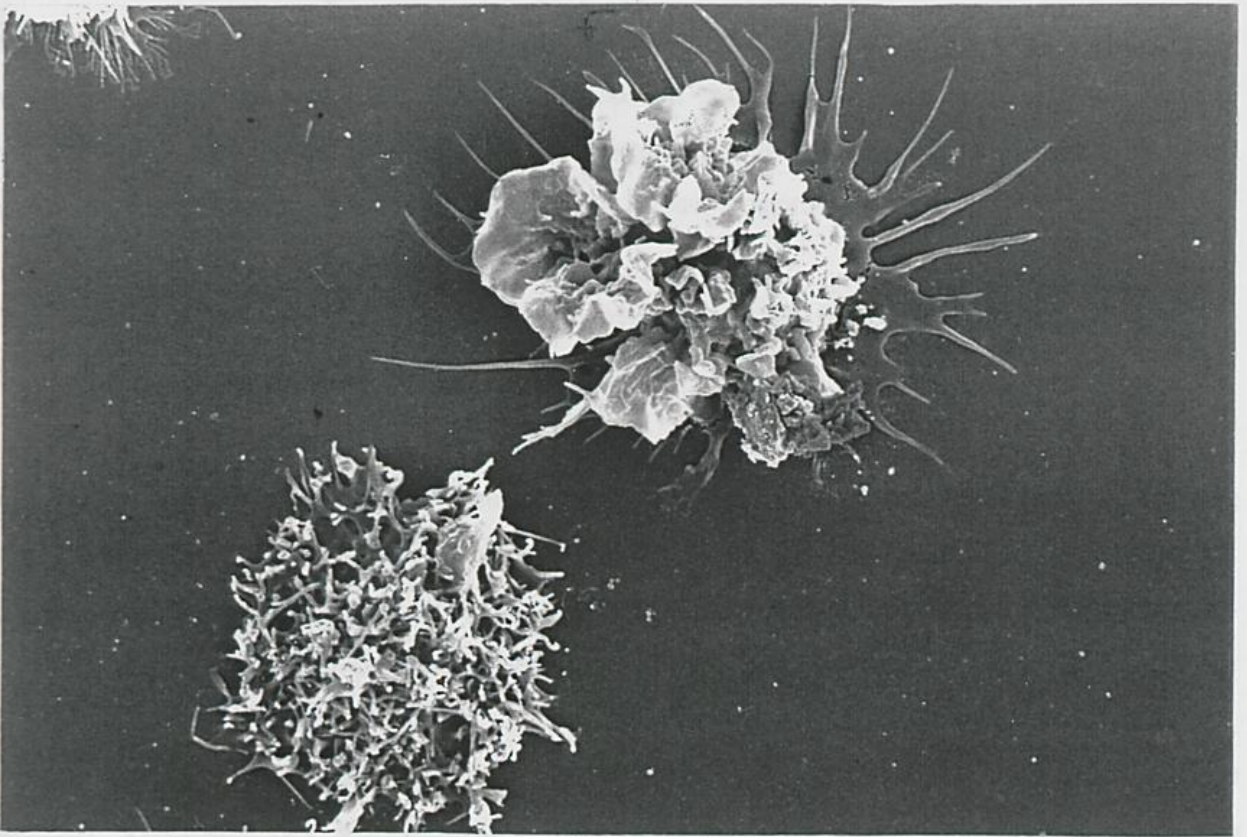


Abb. 47: Langerhanszellen, die über 72 Stunden in epidermaler Zellsuspension kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht von *in situ* gereiften Langerhanszellen; 6480-fache Vergrößerung.