universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

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

Stoitzner, Patrizia

1997

D. Diskussion

urn:nbn:at:at-ubi:2-12558

D. Diskussion

1 Optimierung der Organkultur:

Die Kultivierung von Haut ist eine elegante Methode, um die Emigration von kutanen dendritischen Zellen eingehend zu untersuchen. Durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen diverser Zytokine und Antikörper in das Medium, auf dem die Hautstücke aufschwimmen, kann man deren Einfluß auf die Auswanderung durch Zählung der Zellen im Kulturüberstand bestimmen. Das System ist aber auch sehr fehleranfällig. Die Probleme, die bei dieser Methode auftreten, werden im Verlauf dieses Abschnittes noch weiter diskutiert (D 11).
Eines der Hauptprobleme, das sich gleich zu Beginn der Arbeit stellte, war die Frage, ob die Zytokine und Antikörper auch in ausreichender Menge an ihren Wirkungsort gelangen. Die Substanzen müssen im Laufe der Kultur durch die Dermis in die Epidermis zu den Langerhanszellen gelangen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. In früheren Experimenten an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie wurden Antikörper vor der Tötung der Mäuse lokal intradermal und intraperitoneal verabreicht. Um diese bewilligungspflichtigen Tierversuche zu vermeiden, wurden mehrere Modifikationen im Rahmen dieser Arbeit ausprobiert.

1.1 Veränderung der Bedingungen während der Vorinkubation der Mäuseohren bei +4°C:

Nach dem Abschneiden der Ohren werden diese zunächst im Kühlschrank auf einem mit PBS befeuchteten Tupfer in einer Petrischale für 26 bis 28 Stunden vorinkubiert. Diese Vorinkubation verhindert die spontane Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen, die durch das Abschneiden der Ohren bedingt ist. Allein dieser Vorgang kann, vermutlich durch vermehrte Freisetzung von endogenen Zytokinen, einen Stimulus zur Reifung und Wanderung von kutanen dendritischen Zellen setzen. Während der Vorinkubation bei +4°C werden diese Zytokine, welche die Versuchsergebnisse verfälschen würden, im Gewebe entweder abgebaut oder unwirksam. Nach Abschalten der endogenen Zytokinproduktion kann die Wirkung exogen zugegebener Zytokine und Antikörper besser untersucht werden (47, 48).

Um den Wirkungsgrad der exogenen Zytokine und Antikörper in der Organkultur zu verbessern und dadurch geringere Mengen an Reagenzien zu verbrauchen, wurden die Ohren in der Vorinkubationszeit auf R10-HEPES-Medium mit diversen Zytokin- und Antikörper-Konzentrationen aufgelegt. Die Idee war, daß die Substanzen bereits in dieser Zeit zu ihrem Wirkungsort diffundieren können, um in der nachfolgenden Kultivierung bei 37°C ihre Wirkung besser zu entfalten.
In den unter C 1.1 angeführten Experimenten zeigte sich, daß nach der Organkultur die Zahl der emigrierten kutanen dendritischen Zellen gegenüber der herkömmlichen Methode stark verringert war und die Zellen ein deformiertes Aussehen besaßen. Auch ein Wechsel vom R10-HEPES-Medium nach der Vorinkubation zu R10-Medium für die Inkubation im Brutschrank brachte keine deutliche Verbesserung. Die Zellzahlen waren etwas höher als beim ersten Versuchsansatz, aber die dendritischen Zellen zeigten wiederum eine untypische Form und hatten kaum ausgebildete *veils*. Die erwartete Erhöhung der Wanderungsrate durch Zugabe von TNFα 50 U/ml und die Verringerung derselben durch Antikörper-Zugabe war nur teilweise beobachtbar. Dies läßt auf eine ungenügende Wirkung der Kulturzusätze in diesem modifizierten System schließen. Aus der Deformation bzw. dem Fehlen der *veils* kann man auf einen negativen Effekt der Bestandteile von R10-HEPES auf die Reifung und Wanderung der kutanen dendritischen Zellen schließen. Eine Vorinkubation der Ohren auf R10-Medium war wegen der Instabilität des pH-Wertes nicht durchführbar. Wenn eine nicht toxische Abpufferung des pH-Wertes in diesem Medium während der Vorinkubation gelänge, wäre es interessant, weitere Versuche durchzuführen.

1.2 Vorinkubation der Ohren mit der epidermalen Seite auf dem Medium:

Eine weitere Modifikation des Systems zur Verbesserung der Zytokin- und Antikörperwirkung basiert auf einer Arbeit von Rambukkana (61). Dabei wurde explantierte humane Haut mit der epidermalen Seite nach unten auf Medium mit Zytokin- und Antikörper-Zusätzen inkubiert, damit diese zwischen den verhornten Epithelzellen besser in das Gewebe eindringen können.
In dem in dieser Arbeit angeführten Experiment (C 1.2) wurden die Mäuseohren eine Stunde mit der epidermalen Seite nach unten auf Medium mit diversen Zusätzen inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Hautstücke umgedreht und für weitere

47 Stunden mit der dermalen Seite nach unten im Brutschrank inkubiert.
Die anschließende Zählung zeigte wieder eine starke Verminderung der Zellzahl. Die ausgewanderten dendritischen Zellen zeigten im Gegensatz zur ersten Modifikation deutliche *veils*. Zusätzlich war bei den verkehrt inkubierten Ansätzen eine Wirkung von TNFα 50 U/ml und anti-TNFα zu erkennen. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen von Rambukkana (61), der nach Inkubation der Haut auf IL-1β eine Wanderung der Langerhanszellen zur epidermal-dermalen Junktionszone beobachten konnte. Eine Vorinkubation mit anti-IL-1β konnte eine Kontaktallergen-induzierte Langerhanszellwanderung verhindern.
Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an emigrierten kutanen dendritischen Zellen wäre, daß die Langerhanszellen durch die einstündige Inkubation mit der epidermalen Seite nach unten und durch die umgekehrte Einwirkungsrichtung der Reagenzien ihre Wanderungsrichtung verändert haben und im Gewebe „steckengeblieben" sind. Weiters wäre möglich, daß die während der einstündigen Inkubation in die Luft ragende Dermis ausgetrocknet ist, und die Zellen deshalb nicht mehr durch sie hindurch auswandern konnten.
Diese Modifkation des Organkulturmodelles zeigte einen deutlichen Einfluß der Zytokine und Antikörper. Da sich aber der Wirkungsgrad nicht wesentlich vom bereits von Ortner und Zanella etablierten System (47, 48) unterschied (Vorinkubation auf PBS-feuchtem Tupfer bei +4°C) und zudem die Zellzahlen zu niedrig waren, wurde auch diese Versuchsanordnung in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet.

2 Exogenes TNFα kann in der Organkultur die Migration von kutanen dendritischen Zellen wesentlich beeinflussen:

2.1 Die Wirkung von TNFα ist dosisabhängig:

Die Ergebnisse der Experimente von Ortner, Zanella, Koch und Janke (47, 48) konnten im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Versuchen (C 2.1) bestätigt werden. In einer TNFα-Reihe mit steigender TNFα-Konzentration wurde die Dosisabhängigkeit der Wirkung dieses Zytokins untersucht. In einer Konzentration von 50 U/ml kann TNFα die Emigration von kutanen dendritischen Zellen verstärken. Die Wanderungsrate war durchschnittlich um 26% erhöht, in einzelnen Experimenten gab es sogar Steigerungen um bis zu 99%. Bereits ab einer TNFα-Konzentration von 75 U/ml sank die Zahl der ausgewanderten Zellen auf das Niveau der Kontrolle (R10-Medium ohne Zusätze). Eine Hemmung der Migration war ab 200 U/ml TNFα zu erkennen. Durch Steigerung der Konzentration auf 5000 U/ml konnte die Wanderungsrate um durchschnittliche 48% verringert werden, wobei in Einzelexperimenten eine Hemmung von bis zu 90% auftrat. Die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen kamen durch die bereits angesprochenen Probleme und die Fehleranfälligkeit des Systems zustande (D 11).
Aus diesen Daten kann man auf unterschiedliche Effekte von TNFα, abhängig von der eingesetzten Dosis, schließen. In geringer Dosis (50 U/ml) kann dieses Zytokin die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis verstärken. Dieser Zunahme der dendritischen Zellen im Medium nach 48-stündiger Organkultur steht eine Abnahme der Zelldichte in der Epidermis gegenüber, die durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit MHC-Klasse II sichtbar gemacht werden konnte (C 2.1.4, Abb. 18). In der Dermis waren deutlich ausgeprägte *cords* mit MHC-Klasse-II-positiven Zellen zu sehen (C 2.1.4, Abb. 19).
Die Arbeitsgruppe um Cumberbatch und Kimber machte in ihren Versuchen ähnliche Beobachtungen (23, 34). Nach einer intradermalen Injektion von murinem rekombinanten TNFα war eine zeit- und dosisabhängige Zunahme der dendritischen Zelldichte in den Lymphknoten beobachtbar. Gleichzeitig war eine Abnahme der Zahl an Langerhanszellen in der Epidermis erkennbar. Die maximale Auswanderung von

Langerhanszellen konnte in diesen Versuchen ab einer Konzentration von 50 ng gezeigt werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden 4 ng (= 50 U/ml) als optimale Dosis bestimmt, was aber auf die unterschiedliche Versuchsdurchführung zurückzuführen sein dürfte. Die im Gewebe vorherrschenden Konzentrationen, die *in vivo* zur Emigration der LC führen, sind noch nicht bekannt.
Dieselben Ergebnisse erhielten Senoo et al. nach intradermaler Injektion von murinem rekombinanten TNFα (64). In diesen Versuchen war eine Abnahme der epidermalen NLDC-145-positiven Zellen in der Haut zu beobachten. Gleichzeitig war eine Zunahme der NLDC-145-positiven Zellen in den Lymphknoten sichtbar, was auf eine gerichtete Wanderung der Zellen in lymphatisches Gewebe hindeutet. Roake und Austyn konnten bei systemischer Verabreichung von rekombinantem humanen TNFα eine verringerte Langerhanszellzahl in der Epidermis von Mäusen und die Ausbildung von *cords* in der Dermis feststellen (50). Groves et al. konnten bei freiwilligen Versuchspersonen durch intradermale Injektion von einmal 100 U/ml bzw. 5000 U/ml oder fünfmal 100 U/ml rekombinantem humanen TNFα eine Abnahme der Langerhanszelldichte in der Epidermis und eine Zunahme der Zahl an dermalen dendritischen Zellen nachweisen, was auf eine Rekrutierung von Vorläufern in die Haut hindeutet (65). Zusätzlich konnte die Bildung von inflammatorischen Zell-infiltraten und eine Hochregulierung von diversen Adhäsionsmolekülen in der Haut beobachtet werden.
In den unter C 4.1 angeführten Elisas konnte TNFα nur bei Zugabe in die Organkultur nachgewiesen werden, aber in geringeren Mengen. In den Überständen der Kultur auf reinem R10-Medium ohne Zytokin-Zusätze war die Menge an TNFα immer unter der Nachweisgrenze. Auch bei Zusatz von IL-1β und GM-CSF zum Medium war keine Zunahme an TNFα zu beobachten. Das läßt auf Probleme beim Nachweis des in der Kultur vorhandenen TNFα schließen, da eine Induktion und das Vorkommen von TNFα bei der Emigration von kutanen dendritischen Zellen bewiesen ist (66). Andererseits wäre ein hoher Verbrauch an TNFα während der Organkultur eine mögliche Erklärung dafür, daß dieses Zytokin nicht detektierbar war.

2.2 Die Migrationshemmung bei hohen Dosen TNFα ist nicht auf die Toxizität dieses Zytokins zurückzuführen:

Die Migrationshemmung durch hohe Dosis TNFα wurde bisher mit der vermuteten Toxizität dieses inflammatorischen Zytokins erklärt. Aus den Experimenten unter C 2.1.1 und C 2.1.2 ist ersichtlich, daß TNFα in hoher Dosis (5000 U/ml) zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl emigrierender Langerhanszellen führte. Im Gegensatz dazu war nach MHC-Klasse-II-Färbungen von epidermalen *sheets* zwischen auf TNFα 5000 U/ml und R10 kultivierter Ohrhaut kein Unterschied in der Zelldichte erkennbar (C 2.1.4, Abb. 16, 20). Für diese Diskrepanz zwischen der Langerhanszelldichte in der Epidermis und der Zahl der emigrierten Zellen gibt es zwei Erklärungen. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Langerhanszelldichte in der Haut in dem Ausmaß nicht zu erkennen bzw. nur durch Zählung der verbleibenden Langerhanszellen in der Epidermis bestimmbar. Eine andere Erklärung für die reduzierte Zellzahl im Medium wäre, daß die Langerhanszellen aus der Epidermis auswandern, aber auf ihrer Wanderung in der Dermis in den Lymphbahnen „steckenbleiben". Diese Theorie wurde durch Färbungen der Dermis mit MHC-Klasse II weiter untersucht. In Abb. 21 unter C 2.1.4 kann man im Gegensatz zum Bild der frisch präparierten Haut (C 2.1.4, Abb. 15) und der auf reinem R10-Medium kultivierten Haut (C 2.1.4, Abb. 17) stark vergrößerte und mit Langerhanszellen angefüllte *cords* beobachten, was für eine Inhibierung der Langerhanszellwanderung in der Dermis durch die hohe Dosis TNFα sprechen würde. Diese Hemmung der Wanderung wird durch die Ergebnisse von Groves et al. (65) unterstrichen, die bei intradermaler Injektion von 5000 U/ml rekombinantem humanen TNFα ebenfalls eine Abnahme der Langerhanszellzahl ähnlich wie bei 100 U/ml TNFα erkennen konnten. Die gleichen Daten erhielten Cumberbatch und Kimber (23), die bei Injektion von 50 ng rekombinantem murinen TNFα die maximale Reduktion der Langerhanszelldichte feststellen konnten.

Zur Untersuchung der Toxizität der hohen Dosis TNFα wurden Versuche durchgeführt, in denen die Ohrhaut teilweise über 96 Stunden auf TNFα 5000 U/ml kultiviert wurde. Bei der Zählung und Beobachtung der Zellen im Medium wurde eine unveränderte Zellviabilität festgestellt, wobei berücksichtigt werden muß, daß die toten Zellen während dieser langen Kulturzeit möglicherweise zerfallen und somit nicht mehr unter dem Mikroskop zu sehen waren. Die Wanderungsrate der kutanen

dendritischen Zellen stieg bei der Organkultur bis 96 Stunden stark an (44% bis 162%), was aber durch Zerfall des Epithelverbandes erklärbar ist. Die Auflösung der Epidermis war in immunhistochemischen Färbungen mit Peroxidase deutlich zu erkennen. Um die Zellviabilität der ausgewanderten Zellen zu untersuchen, wurde ein funktioneller Test (oxidative Mitogenese, (59)) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß dendritische Zellen aus den TNFα 5000 U/ml-Kulturen im Vergleich zur Kontrolle (R10-Medium ohne Zusätze) T-Lymphozyten gleich gut stimulieren konnten.
Durch diese Experimente kann eine Hemmung der Migration kutaner dendritischer Zellen durch eine mögliche Toxizität von TNFα in hoher Dosis ausgeschlossen werden. Vielmehr zeigte sich, daß dieser Effekt sehr wahrscheinlich auf eine Inhibierung der Wanderung in der Dermis zurückzuführen ist. Möglicherweise spielt das Gerinnungssystem, das von TNFα beeinflußt werden kann, eine Rolle.

2.3 Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern kann die migrationsfördernde Wirkung von TNFα aufgehoben werden:

Um die Rolle, die TNFα in der Organkultur bei der Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen spielt, genauer zu untersuchen, wurden mehrere Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNFα durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der eine war ein käuflicher, gereinigter polyklonaler Antikörper von Biosource, der andere ein nicht gereinigter Antikörper aus einem Kulturüberstand (V1q) von Dr. Echtenacher aus Regensburg (54).
Beide Antikörper führten bereits im reinen R10-Medium zu einer leichten Verringerung der Anzahl emigrierter Zellen. Diese Hemmung der Migration ist wahrscheinlich auf *in situ* vorhandenes TNFα zurückzuführen, das während der 48-stündigen Organkultur von Keratinozyten gebildet wird und die Langerhanszellen zur Wanderung stimulieren kann. Durch Neutralisierung dieses endogenen TNFα konnte die Wanderungsrate in der Kontrolle um bis zu 30% verringert werden. Die gleichen Ergebnisse erhielt Zanella in ihren Experimenten (48), in denen sie anti-TNFα (V1q) intraperitoneal injizierte und zusätzlich während der Organkultur ins Medium gab. In mehreren Versuchen war eine Hemmung der Migrationsrate um bis zu 70% zu erkennen.
Weiters konnte, wie unter C 2.1.3 angeführt, durch Zugabe von beiden Antikörpern in

die Organkultur die migrationsfördende Wirkung von TNFα 50 U/ml vollständig aufgehoben werden. Bei hoher Dosis TNFα konnten die Antiköper die Migrationshemmung nicht mehr beeinflussen, da sie nicht in ausreichend neutralisierenden Mengen zugegeben worden waren.
Die Arbeitsgruppe von Austyn konnte ebenfalls zeigen, daß durch vorherige Verabreichung von anti-TNFα eine durch LPS induzierte Reduktion der Langerhanszellzahl verhindert werden konnte (50). Cumberbatch und Kimber beobachteten nach systemischer Verabreichung von anti-TNFα eine starke Inhibierung der allergeninduzierten Wanderung der dendritischen Zellen in die Lymphknoten (66). Piguet et al. beobachteten eine verminderte Reaktion sowohl auf Irritantien als auch auf Kontaktallergene durch Vorbehandlung mit anti-TNFα (67).

All diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von TNFα bei der Immunantwort auf bakterielle Infektionen und bei Kontakthypersensibilisierungsreaktionen hin, da sowohl in der Organkultur, als auch in den oben erwähnten Experimenten anti-TNFα die Wirkung von TNFα aufheben konnte. TNFα scheint somit einer der wichtigsten Mediatoren bei der Induktion der Emigration von Langerhanszellen zu sein.

3 Exogenes IL-1 führt in der Organkultur zu einer Migrationssteigerung:

3.1 IL-1 kann erst in hoher Dosis die Migration von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen:

In den von Koch und Janke durchgeführten Vorversuchen war in der IL-1α- und der IL-1β-Reihe erst ab einer Konzentration von 2000 U/ml eine Migrationssteigerung erkennbar (C 2.2.1). Auf dieser Basis wurde in zehn weiteren Versuchen die Wirkung von hoher Dosis IL-1β (2800 bzw. 3000 U/ml) in der Organkultur untersucht.
Trotz schwankender Werte war eine Erhöhung der Wanderungsrate bei hoher Dosis IL-1β ersichtlich (C 2.2.2). Die durchschnittliche Steigerung lag bei 30% (2800 U/ml) bzw. 21% (3000 U/ml), wobei die Wanderungsrate in einem Experiment sogar um 78% erhöht werden konnte. Im Gegensatz zu TNFα kann exogenes IL-1β erst in hoher Dosis die Wanderung von Langerhanszellen beeinflussen.

Die Notwendigkeit von so großen Mengen IL-1β (280 bis 300 ng/ml) könnte auf einen höheren Bedarf an IL-1β als an TNFα für die Stimulation der Emigration von Langerhanszellen hindeuten. Eine andere Erklärung wäre, daß dieser Induktor der Migration schlechter zum Wirkungsort diffundieren kann, oder daß das rekombinante Zytokin eine geringere Wirksamkeit aufweist.

In Versuchen von Enk und Katz konnte gezeigt werden, daß nach einer intradermalen Injektion von 25 bis 50 ng murinem rekombinanten IL-1β eine Reduktion der Langerhanszellzahl in der Epidermis auftrat (36). Der hierbei niedrigere Bedarf an Zytokin ist durch die unterschiedliche Administration zu erklären und deutet auf eine schlechtere Diffusion oder Wirksamkeit des rekombinanten Zytokins in der Organkultur hin.

Die Arbeitsgruppe von Nylander-Lundqvist konnte ebenfalls eine Abnahme der Langerhanszelldichte nach intrakutaner Injektion von rekombinantem IL-1β feststellen, die 24 Stunden nach der Injektion einsetzte und nach 48 Stunden den Höhepunkt erreichte (68). Bei beiden Untersuchungen waren vergrößerte und stärker MHC-Klasse-II-positive Zellen in der Epidermis zu sehen.

Bei der Messung der IL-1β-Konzentration in den Kulturüberständen mit Elisa ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse (C 4.2). Die ermittelten Werte schwankten, wobei IL-1β in den Überständen der R10-Kontrolle und bei Zugabe von TNFα in die Kultur nachweisbar war. Bei der Zugabe von hoher Dosis IL-1β waren annähernd die eingesetzten Mengen meßbar.

Bei der Zugabe von hoher Dosis IL-1α konnte ebenfalls eine Migrationssteigerung beobachtet werden. Daraus kann man schließen, daß dieses von Keratinozyten produzierte Zytokin bei der Induktion der Emigration von Langerhanszellen ebenfalls eine Rolle spielt. Es ist bekannt, daß IL-1α in hoher Dosis denselben Effekt wie IL-1β hat (36) und beide Zytokine an denselben Rezeptor binden. Weiters könnte die Wirkung von IL-1α durch eine Induktion von verschiedenen Zytokinen, wie IL-1β, TNFα, GM-CSF etc. bedingt sein.

3.2 Neutralisierende Antikörper gegen IL-1 können die Migration von kutanen dendritischen Zellen hemmen:

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von IL-1 bei der Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen aus der Haut wurden verschiedene Antikörper gegen IL-1α und IL-1β in der Organkultur verwendet.

Die Ergebnisse waren schwankend, jedoch kam es mehrheitlich zu einer Hemmung der Migration (C 2.2.3). Die Zugabe von anti-IL-1β zu reinem R10-Medium führte meistens zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Dies deutet wie bei TNFα auf ein *in situ* Vorkommen von IL-1β hin, das von Langerhanszellen in der Epidermis produziert wird. Durch Neutralisation des endogenen IL-1β sinkt die Zellzahl der emigrierenden Zellen in der Organkultur. In ihrer Arbeit konnte Ortner (47) ähnliche Beobachtungen machen. Nach intradermaler Injektion von 30 ng IL-1β konnte sie eine Migrationssteigerung um 40% erkennen, bei Applikation von 20 µl anti-IL-1β kam es zu einer Hemmung der Auswanderung um ca. 40%.

In den jetzigen, hier unter C 2.2.3 angeführten Experimenten konnten beide Antikörper im gleichen Maße die migrationsfördernde Wirkung von TNFα 50 U/ml aufheben (C 2.2.3, C 2.3), was auf eine Wechselwirkung zwischen TNFα und IL-1 hindeutet.

Die zahlreichen Schwankungen in diesen Versuchen kamen zum Teil durch das Verwenden von Antikörpern verschiedener Firmen und Chargen, sowie durch Fehler bei der Versuchsdurchführung bzw. durch die zuvor genannten Probleme der Organkultur zustande (D 11).

Eine Kombination von IL-1β und anti-IL-1β konnte aus Kostengründen und dem zu großen Verbrauch an neutralisierendem Antikörper nicht durchgeführt werden.

Die hier angeführten Ergebnisse werden durch Versuche von Enk und Katz bestätigt (36). Bei intradermaler Injektion von IL-1β zusammen mit neutralisierenden Mengen von anti-IL-1β konnte kein Einfluß von IL-1β auf die Langerhanszellen mehr beobachtet werden. Eine Sensibilisierung mit Kontaktallergen (TNCB) konnte durch vorheriges Spritzen von anti-IL-1β ebenfalls verhindert werden. Beim gleichen Versuch zeigte jedoch anti-IL-1α keine Wirkung.

Rambukkana et al. (61) machten bei ihren Experimenten ähnliche Beobachtungen. Durch Vorinkubation humaner Hautexplantate mit anti-IL-1β konnte eine Inhibierung

der Kontaktallergen-induzierten Langerhanszellwanderung erreicht werden. Der gleiche Effekt konnte mit anti-IL-1α, anti-GM-CSF und anti-TNFα nicht beobachtet werden.

All diese Ergebnisse deuten auf ein sehr komplexes Wechselspiel zwischen IL-1 und TNFα hin. Es bleibt zu klären, welches Zytokin das andere induziert, ob es eine bestimmte Reihenfolge der Induktion gibt, oder ob diese vom Auslöser der Immunantwort abhängig ist.

4 Gibt es eine Kaskade zwischen TNFα und IL-1?

Um die oben gestellte Frage zu beantworten, wurden zehn Experimente durchgeführt, in denen verschiedene Kombinationen von IL-1β und TNFα sowie Antikörper gegen diese verwendet wurden (C 2.3). Die statistische Auswertung der Versuche ergab trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse eine deutliche Migrationssteigerung sowohl durch 2800 bzw. 3000 U/ml IL-1β (Wanderungsrate um 24% erhöht) als auch durch 50 U/ml TNFα (Erhöhung um 21%). Durch Zugabe von anti-TNFα und IL-1β in die Organkultur sank die Wanderungsrate fast auf die 100% der Kontrolle. Der gleiche Effekt war bei Kombination von TNFα und anti-IL-1β/ anti-IL-1α zu beobachten.

Diese Experimente dienten der Abklärung, welches Zytokin die Produktion des anderen induzieren kann. Dazu gibt es zwei Hypothesen:

- Die erste besagt, daß das zuerst gebildete TNFα die Produktion von IL-1β induzieren kann. Durch Neutralisierung von TNFα wäre eine Migrationssteigerung durch Zugabe einer optimalen Dosis IL-1β nicht mehr möglich.
- Bei der zweiten Theorie, die auf einer Induktion von TNFα durch IL-1β basiert, wäre umgekehrt durch Neutralisierung mit anti-IL-1β und Zugabe von TNFα 50 U/ml ebenso keine erhöhte Wanderungsrate mehr feststellbar.

Da aber bei beiden Ansätzen eine Aufhebung der Migrationssteigerung durch Antikörperzugabe auftrat, ist vermutlich keines der beiden Modelle zutreffend.

Dafür scheinen mehrere Erklärungen plausibel:

Erstens wäre es möglich, daß die beiden Zytokine so eng miteinander wechselwirken, daß durch Zugabe von Antikörpern und durch Neutralisation eines der beiden Zytokine das andere nicht mehr vollständig wirken kann. Daraus könnte

man dann schließen, daß sowohl TNFα als auch IL-1β für die Emigration von kutanen dendritischen Zellen erforderlich ist, beide in synergistischer Weise wirken und sich gegenseitig induzieren können.

Zweitens könnte es sein, daß sich die Induktion der Zytokinproduktion in der 48-stündigen Organkultur nicht beobachten läßt, da sie sich innerhalb von einigen Minuten abspielt. Enk und Katz (69) konnten nach Applikation von Kontaktallergenen nach 15 Minuten IL-1β-mRNA und erst nach 30 Minuten TNFα-mRNA nachweisen.

Drittens spielen sich in der Haut bei Stimulation der Emigration so komplexe Vorgänge ab, daß sie sich nicht bis ins Detail mit Hilfe der Organkultur untersuchen lassen. Durch Wechselwirkungen der exogenen und der teilweise noch vorhandenen endogenen Zytokine in Kombination mit den Antikörpern könnten die Ergebnisse verfälscht sein.

Viertens ist aus einer Vielzahl von Publikationen ersichtlich, daß die Kaskade je nach verwendeten Stimulantien, seien es bakterielle Bestandteile oder Kontaktallergene, durch unterschiedliche Induktion des ersten Zytokins TNFα oder IL-1β auch beliebig in beide Richtungen gehen kann. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse mehrerer Arbeiten unterstützt, in denen LPS die TNFα- und IL-1α-Produktion induzieren konnte (50, 70). Hingegen wird durch Applikation von Kontaktallergen zuerst IL-1β-Expression eingeleitet und dann erst die von TNFα (61, 69). Da in der Organkultur der erste Stimulus durch Zugabe eines Zytokins gesetzt wird, führt dies zur Induktion der Expression des jeweils anderen. Die Zugabe von TNFα führt zu einer Induktion der IL-1β-Produktion, umgekehrt kommt es durch einen IL-1β-Zusatz ins Medium zu einer Induktion von TNFα. Somit könnte die Kaskade je nach Bedarf in beide Richtungen ablaufen.

Das genaue Wechselspiel beider Zytokine und der Ablauf der Induktion der Emigration von kutanen dendritischen Zellen bedarf noch weiterer Untersuchungen, jedoch mit zusätzlichen Methoden. Eine Möglichkeit bietet die Verwendung von *knock-out* Mäusen, bei denen entweder das Gen für TNFα oder IL-1β bzw. für deren Rezeptoren abgeschaltet ist. In ersten eigenen Pilotexperimenten mit TNFα/β-defizienten Mäusen war eine ungestörte Auswanderung der kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur zu beobachten. Durch Zugabe von TNFα 50 U/ml war eine Migrationssteigerung um 56% gegenüber der R10-Kontrolle zu erkennen. In einem Funktionstest (oxidative Mitogenese, (59)) jedoch erwiesen sich die emigrierten Zellen aus den *knock-out* Mäusen als schwächere T-Zellstimulatoren als die

Kontrollzellen aus C57BL/6-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TNFα Einfluß auf die Wanderung der kutanen dendritischen Zellen hat, aber für die Emigration nicht absolut notwendig ist. Andererseits könnte es auch sein, daß bei Fehlen von TNFα andere Zytokine, wie z.B. IL-1β, dessen Funktion übernehmen können und so das Ablaufen einer Immunreaktion ermöglicht wird.

In anderen Arbeiten mit TNFα-Rezeptor-*knock-out* Mäusen wurde die Rolle von TNFα weiter untersucht. Die Gruppe um Sauder konnte bestätigen, daß TNFα bei Kontakthypersensibilisierungsreaktionen nicht der Hauptmediator ist. Bei TNFα-Rezeptor-I-defizienten Mäusen konnte eine verstärkte Reaktion nach Applikation von Kontaktallergen (DNFB) beobachtet werden, was auf eine mögliche immunsuppressive und anti-inflammatorische Rolle von TNFα hindeutet (71). Weiters konnten sie feststellen, daß der TNFα-Rezeptor II für die Wanderung der Langerhanszellen aus der Haut in die Lymphknoten notwendig ist, da diese ungestört in TNFα-Rezeptor-I-defizienten Mäusen ablaufen konnte (72).

In Versuchen mit IL-1β-defizienten Mäusen konnten Fantuzzi et al. zeigen, daß IL-1β nicht essentiell für eine Immunantwort auf systemisch verabreichte Lipopolysaccharide ist bzw. daß andere Zytokine dessen Rolle übernehmen können (73). Shornick et al. konnten ebenfalls in IL-1β-defizienten Mäusen eine unveränderte Empfindlichkeit bei endotoxischem Schock, hingegen eine gestörte Reaktion auf Kontaktallergen-Applikation (TNCB) feststellen. Durch intradermale Injektion von IL-1β vor Antigenkontakt konnte dieser Defekt ausgeglichen werden (74). Die Gruppe von Sauder beobachtete bei lokaler Injektion von IL-1-Rezeptor-Antagonist in sensibilisierten Mäusen eine abgeschwächte Reaktion auf Kontaktallergene (75). Somit scheint IL-1β im Gegensatz zu TNFα eine wichtige Rolle bei Hypersensibilisierungsreaktionen, aber eine geringere bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen zu spielen.

5 Bakterielle Bestandteile wie LPS können in der Organkultur die Emigration von kutanen dendritischen Zellen steigern:

Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) können die Migration von dendritischen Zellen aus nicht lymphoidem Gewebe und deren Reifung beeinflussen (50, 76). In mehreren Experimenten wurde der Einfluß von verschiedenen Dosen LPS auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen in der Organkultur untersucht (C 2.4). Dabei zeigte sich, daß geringe Mengen (10 ng/ml) keine Wirkung auf die Emigration hatten. Ab einer Konzentration von 100 ng/ml stieg die Zahl an ausgewanderten dendritischen Zellen deutlich an und sank bei großen Mengen LPS (1 μg/ml) wieder unter das Niveau der Kontrolle. Die Hemmung der Migration bei hoher Dosis LPS war vergleichbar zur beobachteten Hemmung bei TNFα 5000 U/ml. Daraus kann man entweder auf einen negativen, eventuell toxischen Effekt auf die Zellen oder auf eine starke Induktion von TNFα durch LPS schließen. Durch die hohe Konzentration an TNFα im Gewebe könnte der gleiche Effekt auftreten wie bei Zugabe von hoher Dosis TNFα in die Organkultur.

Diese Erklärung wird durch die Ergebnisse von Verhasselt et al. bestätigt, die beobachten konnten, daß LPS bei Zugabe zu dendritischen Zellkulturen die Produktion einiger Zytokine, wie TNFα, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 dosisabhängig stimulieren kann (70). Die Gruppe von Roake und Austyn (50) konnte nach systemischer Verabreichung von LPS eine Reduktion der Zellzahl in Mäuseherzen und –nieren feststellen. Zusätzlich war die Zahl der Langerhanszellen in der Epidermis verringert und *cords* waren in der Dermis sichtbar. Bei systemischer Verabreichung von IL-1 und TNFα waren ähnliche Effekte zu sehen. Eine vorherige Gabe von anti-TNFα verhinderte die durch LPS induzierte Auswanderung von Langerhanszellen aus der Haut, aber nicht die von dendritischen Zellen aus Herz und Niere.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit LPS war bei Zugabe von anti-TNFα (V1q) in die Organkultur ebenfalls eine Reduktion der Zahl an emigrierten Zellen im Medium erkennbar. Bei Zugabe einer Kombination von anti-IL-1β und anti-IL-1α war die gleiche bzw. eine stärkere Hemmung der Migration sichtbar (C 2.4).

Aus diesen Daten kann man auf eine indirekte Wirkung bakterieller Bestandteile, wie

zum Beispiel LPS, auf die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen schließen. Dieser Einfluß von LPS ist auf eine Stimulation der Produktion diverser Zytokine zurückzuführen. In der Haut wird TNFα und IL-1α induziert, die, wie bereits besprochen, die Kaskade in Richtung IL-1β induzieren und zusammen die Emigration der Zellen auslösen. Um diesen Zyklus weiter zu führen, kann LPS über diverse Zytokine (eventuell GM-CSF, IL-6, Chemokine) Vorläufer kutaner dendritischer Zellen in die Dermis rekrutieren. Tatsächlich konnten Roake und Austyn in weiteren Arbeiten neben der Auswanderung der dendritischen Zellen durch systemische Verabreichung von LPS eine Rekrutierung von ihren Vorläufern in Herz, Niere und Dermis feststellen (76).
In den unter C 4.4 angeführten Elisa-Messungen war nach Zugabe von LPS in die Organkultur eine leichte GM-CSF- und auch IL-1β-Zunahme zu beobachten. TNFα hingegen war in keiner der drei Messungen nachweisbar, obwohl LPS die Produktion von TNFα stimulieren kann (70). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, daß Probleme beim Nachweis dieses Zytokins im Elisa auftraten.

6 Chemokine wie MIP-1α haben Einfluß auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Chemokin MIP-1α auf einen möglichen Einfluß in der Organkultur getestet, weil es zusammen mit MIP-2 in Langerhanszellen der Epidermis von Mäusen gebildet wird (32).
Dieses Chemokin zeigte eine dosisabhängige Wirkung auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen, wie es auch bei TNFα, IL-1 und LPS zu beobachten war. In sieben Experimenten (C 2.5) konnte bei einer Konzentration von 10 ng/ml MIP-1α eine Hemmung der Wanderung beobachtet werden. Ab einer Menge von 20 ng/ml schwankten die Zellzahlen um die Werte der Kontrolle (R10 ohne Zusätze) und deuteten teilweise auf eine Migrationssteigerung hin. Bei einer Zugabe von 40 ng/ml und 70 ng/ml MIP-1α ins Medium war meist eine Erhöhung der Wanderungsrate erkennbar. Die hohe Dosis MIP-1α (100 ng/ml) führte zu einer Reduktion der Emigration auf das Niveau der Kontrolle.
Diese Daten werden durch Arbeiten von Sozzani et al. unterstützt (40). Sie konnten eine Wanderung von dendritischen Zellen aus humanem Blut entlang eines positiven

Gradienten von C-C-Chemokinen, darunter MIP-1α, und anderen chemotaktischen Agenzien in einer Chemotaxis-Mikrokammer nachweisen. Die gleichen Ergebnisse erzielten Xu und Wang mit CD1a-positiven kultivierten dendritischen Zellen aus humanem Nabelschnurblut (77). Die C-C-Chemokine MCP-1 und MCP-2 konnten diese Zellen in der oben erwähnten Kammer zur Migration stimulieren. MIP-1α wurde in diesen Versuchen nicht getestet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde MIP-1α 40 ng/ml mit anti-TNFα bzw. anti-IL-1β in der Organkultur kombiniert, um ein mögliches Zusammenspiel mit inflammatorischen Zytokinen zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Beide Antikörper konnten die migrationsfördernde Wirkung von MIP-1α aufheben. Diese Daten deuten auf einen möglichen indirekten Einfluß von MIP-1α über TNFα und IL-1β auf die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen hin.

Eine andere Erklärung für die erhöhten Zellzahlen im Medium mit MIP-1α-Zusatz wäre, daß das Chemokin Vorläufer der Langerhanszellen von der Dermis in die Epidermis rekrutiert und daher zu einer verstärkten Auswanderung führt. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Nakamura et al. bestärkt (41). Hierbei konnte mit einem transgenen Mausmodell nachgewiesen werden, daß ein anderes Chemokin, nämlich MCP-1, dendritische Zellen und Langerhanszellen in die Haut rekrutieren kann. Bei verstärkter Bildung von MCP-1 in der basalen Schicht der Epidermis war die Zahl der Langerhanszellen unverändert. Jedoch war eine große Zunahme an MHC-Klasse-II-positiven Zellen in der Dermis zu sehen, die meist an der epidermal-dermalen Junktionszone zu finden waren.

Die genaue Wirkung von MIP-1α und anderen Chemokinen in der Haut und deren Einfluß auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen erfordert noch weitere Untersuchungen.

7 IL-4 und IL-10 haben keinen Einfluß in der Organkultur:

In dieser Arbeit wurde die Wirkung zwei weiterer Zytokine auf die Wanderung kutaner dendritischer Zellen untersucht. IL-4 und IL-10, die beide eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Lymphozyten und der Inhibierung der Monozyten/ Makrophagenaktivierung und –funktion spielen, wurden dabei getestet.

Die Annahme war, daß es bei Zugabe von IL-4 in die Organkultur zu einer verstärkten Migration kommen könnte. Vielleicht kann dieses Zytokin Vorläuferzellen in der

Haut dazu stimulieren, sich zu Langerhanszellen bzw. zu dermalen dendritischen Zellen zu entwickeln. Sowohl 200 U/ml als auch 400 U/ml IL-4 zeigten im ersten Versuch eine hemmende Wirkung, im zweiten hingegen keinen Einfluß auf die Emigration, da die Zellzahlen auf dem Niveau der Kontrolle lagen (C 2.6). Die emigrierten Zellen besaßen ein schöneres dendritisches Aussehen mit deutlicher ausgebildeten *veils* als die Zellen im reinen R10-Medium. Aus diesen Daten kann man auf einen Einfluß von IL-4 auf die Reifung der auswandernden kutanen dendritischen Zellen schließen. Die Wanderung selbst kann durch Zugabe von IL-4 jedoch nicht gesteigert werden.

Diese Annahme leitet sich aus Arbeiten von Sallusto und Lanzavecchia (62) sowie Romani et al. (45) ab. Aus dem peripheren Blut isolierte Monozyten können sich bei Kultivierung über 10 Tage mit GM-CSF und IL-4 zu reifen dendritische Zellen entwickeln.

IL-10 ist ein Antagonist von verschiedenen Zytokinen, darunter TNFα, IL-1β und MIP-1α. Es wäre also vorstellbar, daß durch Neutralisation dieses Interleukins die Emigration von kutanen dendritischen Zellen verstärkt werden kann, da dann die inflammatorischen Zytokine besser wirken könnten. In der Organkultur zeigte sich jedoch das Gegenteil, da durch Zugabe von 10 µg/ml und 20 µg/ml anti-IL-10 eine Hemmung der Wanderung auftrat, die annähernd auf dem Niveau von TNFα 5000 U/ml lag (C 2.6). Die Zellen hatten keine so deutlichen *veils*, wie bei Zugabe von IL-4.

Buelens et al. konnten zeigen, daß IL-10 die Entwicklung von dendritischen Zellen aus PBMC trotz GM-CSF und IL-4 in der Kultur hemmen kann (42). IL-10 scheint durch seine antagonistische Wirkung die Entwicklung und Wanderung von Monozyten und dendritischen Zellen zu unterdrücken.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß beide Zytokine keinen bzw. einen leicht negativen Effekt in der Organkultur zeigten. Die Frage, ob sie die Wanderung von kutanen dendritischen Zellen beeinflussen können, oder ob die verwendeten Dosen in der Organkultur nicht optimal waren, bleibt noch zu klären.

8 GM-CSF erhöht die Zellviabilität und beschleunigt die Reifung der kutanen dendritischen Zellen:

GM-CSF, das bekanntlich die Reifung von dendritischen Zellen induzieren kann (45, 53), wurde in der Organkultur auf Einfluß auf die Wanderung und die Zellviabilität untersucht. In mehreren Versuchen waren schwankende Ergebnisse bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen GM-CSF zu sehen (C 3.1). Der Zusatz von 2000 U/ml und 5000 U/ml während der 48-stündigen Organkultur führte teilweise zu einer leichten Zellzahlerhöhung, manchmal aber auch zu einer geringen Zellzahlerniedrigung. Unter dem Mikroskop waren schöne Zellen mit deutlichen *veils* erkennbar. Dies deutet auf eine Wirkung von GM-CSF auf die Zellviabilität und Reifung der emigrierten Zellen hin. Die Wanderung wird durch dieses Zytokin nicht wesentlich beeinflußt. Die Zellzahlerhöhung kommt durch die größere Überlebensrate der ausgewanderten Zellen im Medium oder aufgrund einer Induktion der Emigration durch die beschleunigte Reifung zustande.

Bei diesen Versuchen wurde unter anderem die Wirkung von TNFα und GM-CSF auf bereits emigrierte kutane dendritische Zellen getestet. Dazu wurde zu Zellen, die in den ersten 24 Stunden der Organkultur ausgewandert waren, TNFα in verschiedenen Dosen (50, 100, 5000 U/ml) und GM-CSF 1000 U/ml zugegeben. Bei der anschließenden Zählung konnten teilweise erhöhte Zellzahlen festgestellt werden, wobei die Zellen wiederum ein schöneres dendritisches Aussehen aufwiesen als Zellen aus reinem R10-Medium bzw. Zellen aus den 48 Stunden-Kulturen.

In einem Zusatzversuch konnte nachgewiesen werden, daß allein der Mediumwechsel während der Organkultur einen positiven Effekt auf die Zellen hatte. Durch die Zufuhr frischer Nährstoffe und Zytokine und aufgrund des stabileren pH-Wertes, der ansonsten während der 48 Stunden-Kultur abnahm, starben einerseits weniger Zellen ab, andererseits kam es zu einer besseren Ausreifung. Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, daß in der zweiten Hälfte der Organkultur (24-48 Stunden) mehr Zellen auswanderten als in den ersten 24 Stunden, wie bereits Ortner in ihrer Arbeit feststellen konnte (47).

Die Erhöhung der Zellviabilität und die Reifung von Langerhanszellen durch GM-CSF und TNFα konnte bereits in Versuchen von Caux et al. gezeigt werden (78). Heufler et al. (37) und Witmer-Pack et al. (46) beobachteten die Reifung und Erhöhung der Viabilität von Langerhanszellen in angereicherten Kulturen durch Zusatz von

GM-CSF und IL-1. In Versuchen von Koch et al. mit TNFα (35) zeigte sich, daß TNFα die Viabilität von murinen Langerhanszellen ebenfalls erhöhen, aber im Gegensatz zu GM-CSF die funktionelle Reifung nicht vollständig induzieren kann.
Ein möglicher Einfluß von GM-CSF auf die Migration von kutanen dendritischen Zellen könnte durch die verstärkte Reifung und die daraus resultierende Induktion der Auswanderung bedingt sein. Im Humansystem wurde eine Wanderung von Langerhanszellen *in vitro* nach GM-CSF-Zugabe in einer Chemotaxis-Mikrokammer beobachtet (79). In einer Arbeit von O´Sullivan et al. konnte eine Zunahme der Ia-positiven Langerhanszellen in der Epidermis nach Kultur von Maushaut mit GM-CSF nachgewiesen werden (80), was auf eine Regulation der Langerhanszellzahl durch GM-CSF hindeutet.
Interessante Ergebnisse ergaben sich bei den Messungen von GM-CSF in den Überständen der Organkultur, denn in allen war GM-CSF zu finden (C 4.3). Es zeigte sich sogar eine Zunahme der Konzentration bei Zusatz von TNFα und IL-1β in die Kultur. Diese Daten deuten darauf hin, daß durch inflammatorische Zytokine induziertes GM-CSF bei der Emigration von kutanen dendritischen Zellen eine wichtige Rolle spielt.

9 Mögliches Zusammenspiel der Zytokine der Haut:

Das *in situ* vorhandene **GM-CSF**, das ständig von Keratinozyten neu gebildet wird, kann mit Hilfe von **TNFα und IL-1**β, die die Expression des GM-CSF-Rezeptors hinaufregulieren, die Reifung der Langerhanszellen in der Epidermis fördern und sie somit zur Auswanderung stimulieren. TNFα und IL-1β können in einem sehr engen Wechselspiel kaskadenartig die Produktion des jeweils anderen Zytokins beeinflussen und gemeinsam die Migration vor allem von Langerhanszellen, aber auch die von dermalen dendritischen Zellen steigern. Die Auswanderung der Langerhanszellen wird dadurch ermöglicht, daß beide Zytokine in der Lage sind, die bestehende Verankerung über E-cadherin zwischen den Keratinozyten und Langerhanszellen zu lösen. In mehreren Arbeiten von Udey und Schwarzenberger wurde die Funktion und das Vorkommen von E-cadherin, einem Calcium-abhängigen homophilen Adhäsionsmolekül, untersucht. Sie konnten zeigen, daß E-cadherin von murinen dendritischen Zellen in Haut-assoziierten Lymphknoten und frisch präparierten Langerhanszellen exprimiert wird und der Lokalisation von

Langerhanszellen in der Epidermis dient (81). Nach Applikation des Kontaktallergens TNCB war, wie bei emigrierten und kultivierten Langerhanszellen, eine verminderte E-cadherin-Expression zu erkennen. Der gleiche Effekt war nach Injektion von TNFα und IL-1β in Ohrhaut zu beobachten (82). Somit führt eine verringerte E-cadherin-Expression durch lokale Zytokinproduktion nach Antigenkontakt zur Emigration und Initiation einer Immunantwort. **LPS**, das im Falle eines mikrobiellen Angriffs das auslösende Agens ist, kann durch Induktion von TNFα und **IL-1α** indirekt die Emigration kutaner dendritischer Zellen auslösen. Das Chemokin **MIP-1α** kann Vorläuferzellen aus der Dermis in die Epidermis rekrutieren und/oder die Wanderung der Langerhanszellen auf indirektem Weg über TNFα und IL-1β fördern.

10 Untersuchung der kutanen dendritischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Rasterelektronenmikroskopie:

Für die morphologischen Untersuchungen wurden kutane dendritische Zellen *in situ* in kultivierter und unkultivierter Haut und *in vitro* in Zellsuspension nach Isolierung, Reinigung und teilweiser Kultivierung mit verschiedenen Markern gefärbt (C 5). Der Antikörper **In-1**, der an die invariante Kette binden kann (55), wurde auf Langerhanszellen aller Reifungsstadien *in situ* und *in vitro* nachgewiesen. Das deutet auf eine ständige Präsenz dieses Moleküls hin, das bei unreifen dendritischen Zellen als Indikator für die Fähigkeit zu prozessieren dient. Es war jedoch zu beobachten, daß die Färbung in der unkultivierten Epidermis am stärksten war (Abb. 34), was eine hohe invariante Kette-Expression bei prozessierenden Langerhanzellen beweist. In kultivierter und unkultivierter Dermis war auf dermalen dendritischen Zellen und emigrierenden Langerhanszellen in *cords* In-1-Expression nachweisbar.
Daß die invariante Kette bei der Reifung der Zellen nicht verloren geht, deutet entweder auf noch teilweise unreife Zellen in der Suspension, da die Reifung nicht synchron stattfindet (83), oder auf Restmoleküle durch einen langsamen Abbau in den Zellen hin.
Der Reifungsmarker **2A1** (53) konnte nur auf reifen dendritischen Zellen (Abb. 35) und nicht auf Langerhanszellen in unkultivierter Haut nachgewiesen werden. Sehr schön war die Auswanderung der Langerhanszellen in den *cords* zu beobachten, in

denen einige In-1-positive und einige 2A1-positive Langerhanszellen zu sehen waren (Abb. 36, 37). Dies ist auch ein Indiz dafür, daß wahrscheinlich nicht alle Zellen zu Beginn der Wanderung reif sind, sondern erst während ihrer Wanderung oder im Medium ausreifen.
Durch die Organkultur und ergänzende Immunfluoreszenzfärbungen lassen sich Erkenntnisse über die Wanderungs- und Reifungsmechanismen der Langerhanszellen der Epidermis gewinnen, da durch Färbungen der epidermalen *sheets* nach der Organkultur Veränderungen in der Zelldichte erkennbar sind. In wie weit die dermalen dendritischen Zellen in der Organkultur eine Rolle spielen, kann nur durch getrennte Epidermis- und Dermis-Kultur untersucht werden.

Aus den **Rasterelektronenmikroskopie**fotos ist der Verlauf einer epidermalen Organkultur gut erkennbar (C 6.1.1, Abb. 38). Die ersten Langerhanszellen erscheinen kurz nach Beginn der Kultur, wahrscheinlich schon innerhalb einer Stunde. Diese emigrierenden Zellen könnten sich bereits beim Tod der Maus auf Wanderung befunden haben und sind deshalb nicht auf die Kultivierung zurückzuführen. Erst ab einer Kulturzeit von 15 Stunden waren Zellen mit deutlichen *veils* zwischen den Epithelzellen zu erkennen. Die Zahl der emigrierenden Zellen nahm während der weiteren Kultur beständig zu, wobei nach 25 Stunden Kultur ein beginnender Zerfall des Epithels zu sehen war. Daher könnten einige Zellen bei der Kultur von Epidermis passiv ins Medium gelangt sein.
Bei der Betrachtung der Dermisunterseite einer ganzen kultivierten Ohrhälfte waren ebenfalls auswandernde dendritische Zellen zwischen den Bindegewebsfasern und Fibrozyten sichtbar, wobei nach 48 Stunden Kultur noch kein Zerfall zu sehen war (C 6.1.2, Abb. 39-41). Es waren keine Öffnungen von Lymphbahnen zu erkennen, und die Verteilung der emigrierenden Zellen war eher zufällig. Diese Beobachtung widerspricht den Daten aus den Immunfluoreszenzfärbungen, wo deutliche Anhäufungen der Zellen in *cords* in der Dermis zu beobachten waren. Es wäre möglich, daß die Lymphgefäße durch Trennung der Ohrhälften vor der Kultur so zerstört werden, daß sie nicht mehr zu erkennen sind. Weiters wäre ein Wanderungsweg der dendritischen Zellen nicht nur entlang der Lymphbahnen, sondern auch diffus durch das Bindegewebsgeflecht eine Erklärung für die zufälligen Austrittsorte der Zellen. Diese Annahme wird durch unveröffentlichte Beobachtungen von Mitarbeitern von Romani bestätigt, die in der Transmissionselektronenmikroskopie Lücken in den *cords* feststellen konnten. Durch offene Enden des

Lymphgefäßsystems könnten kutane dendritische Zellen in das Bindegewebe der Dermis und über dieses in ein Sammelgefäß an der Basis des Ohres gelangen, von wo aus die weitere Wanderung in die Lymphknoten stattfindet.
Die Rasteruntersuchungen der ausgewanderten Zellen nach 24 und 48 Stunden aus der Epidermis und der Dermis zeigten einen leichten Unterschied in der Form und in der Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen nach 24 Stunden (C 6.2, Abb. 42, 43). Die in 48 Stunden emigrierten Zellen hatten teilweise schon deutliche *veils* ausgebildet (Abb. 44, 45). Die Zahl der dermalen dendritischen Zellen und teilweise auch ihre Größe war geringer als die der Langerhanszellen (Beobachtungen im Lichtmikroskop). Beim Vergleich der *in situ* (Organkultur) und der *in vitro* gereiften (EC-Suspension) Langerhanszellen waren keine Unterschiede zu sehen (C 6.2, Abb. 46, 47).

11 Kritik an der Organkultur:

Die bei dieser Arbeit verwendete Methode ist ein gutes Modell, um die Auswanderung von kutanen dendritischen Zellen zu untersuchen. Durch Trennung von Epidermis und Dermis mit Hilfe der Dispase wäre eine getrennte Untersuchung der Langerhanszellwanderung und der von dermalen dendritischen Zellen möglich. Da sie aber aufwendig ist und die Epidermis nach bereits 25 Stunden Kultur Zerfallserscheinungen zeigte (C 6.1.1), wurde die Kultur mit der kompletten Ohrhaut durchgeführt. Eine Unterscheidung der beiden Zelltypen war somit nicht möglich, aber durch Versuche mit getrennten Kulturen ist bekannt, daß ein Teil der Zellen im Kulturüberstand aus der Epidermis stammt und ein Teil dermaler dendritischer Zellen mitauswandert.
Einige Probleme der Organkultur waren bereits von Ortner und Zanella (47, 48) beseitigt worden, dennoch waren noch weitere Fehlerquellen vorhanden. Um die Wirkung von exogen zugegebenen Zytokinen und Antikörpern zu testen, mußte die endogene Zytokinproduktion abgeschaltet werden. Durch eine Vorinkubation der Ohren bei +4°C über 26 bis 28 Stunden wurde dies erreicht. Trotzdem sind Verfälschungen der Ergebnisse durch noch wirksame endogene Zytokine und während der Kultur gebildete Zytokine nicht auszuschließen. Dies ist das Hauptproblem der Organkultur, da durch das Vorhandensein einer spontanen Migration kein ruhendes System vorliegt, sondern versucht wird, ein laufendes zu bremsen oder zu beschleunigen.

UBI

Während der 48-stündigen Organkultur war eine Gelbfärbung des Mediums zu beobachten, was auf eine Senkung des pH-Wertes hindeutet. Diese pH-Senkung und der Verbrauch der Nährstoffe hatten teilweise einen negativen Effekt auf die Zellen, was zu Deformation und undeutlicher Ausbildung der *veils* führte. Dadurch bedingt traten Zählfehler auf. Da aber ein Wechsel des Mediums aufgrund des hohen Verbrauchs an Zytokinen und Antikörpern nicht möglich war, wurde die Kultur meist über 48 Stunden mit dem gleichen Medium durchgeführt.

In vielen Experimenten waren große Schwankungen der Zellzahlen zu beobachten, sodaß die Befunde bezüglich Migrationsteigerung und –hemmung nicht eindeutig zu interpretieren waren. Diese Unterschiede kamen durch Fehler bei der Versuchsdurchführung zustande. Bei der Herstellung der Medien wurden geringe Mengen an Zytokinen und Antikörpern zu großen Mengen R10-Medium pipettiert, wobei es leicht zu Pipettierfehlern kommen konnte. Durch die Verwendung von Reagenzien verschiedener Firmen und Chargen traten zusätzliche Schwankungen auf. Auch die Wirksamkeit der Substanzen in diesem System war nicht immer nachgewiesen.

Die größte Fehlerquelle liegt aber in der Zählung der Zellen in der Zählkammer. Durch ungenügende Resuspendierung der Zellpellets, durch Klumpung der Zellen, falsches Pipettieren und die bereits erwähnte undeutliche Ausbildung der *veils* kam es schnell zu Zählfehlern. Die Standardabweichung bei zwei- oder dreimaliger Zählung war teilweise sehr groß, weil zwischen mehreren Zählungen der gleichen Probe deutliche Unterschiede in der Zellzahl auftraten.

Aus diesen hier genannten Gründen ist die Methode der Organkultur zur Bestimmung der Wirkung verschiedener Zytokine und Antikörper auf die Emigration von kutanen dendritischen Zellen nur eingeschränkt verwendbar. Es lassen sich eindeutig Tendenzen aus den Zählungen der Kulturen ablesen, aber zur endgültigen Interpretation der Ergebnisse bedarf es ergänzender Methoden. Zu diesen zählen Versuche mit *knock-out* Mäusen, denen durch Ausschalten von Genen verschiedenste Zytokine und Rezeptoren fehlen; weiters die Analyse der Zytokine in der Organkultur auf mRNA-Ebene mit PCR, Northern Blots und *in situ* Hybridisierung bzw. auf Protein-Ebene mit Elisa.