Aus der
Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Langzeitkultur von humanen Langerhanszellen: Phänotypische Eigenschaften und Apoptose

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Cornelia Henschke
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter:
1. Prof. Dr. G. Kolde
2. Prof. Dr. J. Knop
3. Prof. Dr. Ch. Neumann

Datum der Promotion: 23. Februar 2001

1 Einleitung 5
2 Versuchsdurchführungen 10
2.1 Isolierung und Anreicherung von Langerhanszellen 11
2.1.1 Versuchsprinzip 11
2.1.2 Versuchsdurchführung 11
2.1.2.1 Versuchstag 1 12
2.1.2.2 Versuchstag 2 und 3 13
2.1.2.3 Versuchstag 4 13
2.2 Kultur der Langerhanszellen 15
2.3 Elektronenmikroskopie 17
2.3.1 Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie 17
2.3.2 Fixierung der Langerhanszellen 17
2.3.3 Entwässerung der Langerhanszellen 18
2.3.4 Einbettung 20
2.3.5 Schneiden der Präparate 20
2.4 Immuncytochemie unter Verwendung der APAAP-Technik 21
2.4.1 Versuchsprinzip 21
2.4.2 Versuchsdurchführung 23
2.5 Cell Death Detection ELISA (CDDE) 26
2.5.1 Versuchsprinzip 26
2.5.2 Probenvorbereitung 27
2.5.3 Versuchsdurchführung 27
2.5.3.1 Versuchstag 1 28
2.5.3.2 Versuchstag 2 28
3 Ergebnisse 30
3.1 Zeitverlauf der Viabilität der Langerhanszellen in der Kultur: 30
3.2 Qualitativer Nachweis der Apoptose durch Elektronenmikroskopie 31
3.2.1 Beschreibung der Bilder 31
3.2.2 Elektronenmikroskopische Bilder 34
3.3 Nachweis und quantitative Bestimmung der Apoptose von Langerhanszellen 39
3.4 Immuncytologische Untersuchungen 40

3.4.1 APAAP-Färbungen-Bilder 42
3.4.1.1 Durchführung der Fotografien 42
3.4.1.2 Beschreibung der Bilder 42
3.4.1.3 Fotografien 44
4 Diskussion 50
5 Literaturverzeichnis 63
6 Anhang: Materialiensammlung 76
6.1 Geräte 76
6.2 Medien 77
6.3 Cell Death Detection ELISA (CDDE)-Kit (Boehringer Mannheim) 78
6.4 Immuncytochemie 79
6.4.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) 79
6.5 Zellanreicherung 81
6.6 Elektronenmikroskopie 81
6.7 Abkürzungen 82

Lebenslauf 84
Erklärung an Eides Statt 86

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt das Verhalten von epidermalen dendritischen Zellen - Langerhanszellen - in Kultur sowie die Art und Weise ihrer Elimination. Langerhanszellen wurden 1868 von dem Medizinstudenten Paul Langerhans lichtmikroskopisch entdeckt (Wolff, K.; 1992). Unter dem Lichtmikroskop lassen die Langerhanszellen ein klares Cytoplasma erkennen. In frischen, aus der Epidermis gewonnenen Zellsuspensionen erscheinen sie als runde Zellen mit einer haarigen Oberfläche (Schuler, G. et al; 1992). Der Nachweis, daß es sich bei einer epidermalen dendritischen Zelle um eine Langerhanszelle handelt, gelingt lichtmikroskopisch nur mit immuncytochemischen Methoden, wie zum Beispiel durch APAAP-Färbung (Cordell, J. et al; 1984), bei der ausgenutzt wird, daß sie die einzigen CD 1a-positiven Zellen in der Epidermis sind (Romani, N. et al; 1992a). Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung erkennt man in der Langerhanszelle ein spezifisches Zellorganell. Dieses von Birbeck erstmals beschriebene und nach ihm benannte Birbeck-Granulum, welches eine Form wie ein Tennisschläger hat, gibt es nur in Langerhanszellen (Birbeck, A. et al; 1961). Durch den elektronenmikroskopischen Nachweis von Birbeck-Granula lassen sich deshalb dendritische Zellen als Langerhanszellen identifizieren.

Pathophysiologisch spielt die Langerhanszelle eine wichtige Rolle bei der Kontaktallergie. Sie ist die auslösende Zelle bei der Sensibilisierung in der Haut (Stingl,

G. et al; 1978). Mittels Immunfluoreszenz, durch Flußcytometrie und ultrastrukturellen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß antigenpräsentierende Zellen der Haut während der Sensibilisierung in die Lymphknoten wandern (Macatonia, S. et al; 1987; Kripke, M. et al; 1990). Bei Patienten mit Kontaktdermatitis konnten mehr Langerhanszellen in der Epidermis gezählt werden als bei gesunden Individuen (Forsey, R.F. et al; 1998). Die primäre Funktion der Langerhanszellen besteht in der Präsentation von Antigen im Lymphknoten (Stingl, G. et al; 1992), wo sie eine Hapten-spezifische T-Zellantwort induzieren (Silberberg-Sinakin, I. et al; 1976). Dies geschieht über Oberflächenrezeptoren wie LFA-3 (Roitt, I; 1995b) sowie diverse Cytokinrezeptoren (Schuler, G. et al; 1992; Chatelain, R. et al; 1998; Smith, C.H. et al; 1998). In vivo verändern epidermale Langerhanszellen nach dem Kontakt mit einem Allergen ihren Phänotyp und ihre Funktion. In der Haut von Mäuseohren waren Langerhanszellen 24 Stunden nach dem Bestreichen mit einem Kontaktallergen größer und zeigten eine stärkere Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (Kolde, G. et al; 1987; Aiba, S. et al; 1990). Zudem verbesserte sich die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren.

Genauer konnten Verhalten und Funktion erst untersucht werden, nachdem man Wege gefunden hatte, Langerhanszellen zu isolieren und in Kultur zu bringen. So kultivierte und untersuchte Schuler murine Langerhanszellen (Schuler, G. et al; 1985). Während dieser Kultur entwickelten sich die Langerhanszellen zu reifen T-Zell-stimulierenden Zellen. In der gemischten Leukozyten-Reaktion (mixed leucocyte reaction=MLR) konnte gezeigt werden, daß hinzugegebene T-Zellen von frisch isolierten Langerhanszellen nur relativ schwach stimuliert werden. Das Stimulationsvermögen der

Langerhanszellen wächst nach dreitägiger Kultivierung beträchtlich an (Inaba, K. et al; 1986; Cohen, P. et al; 1992; Romani,N.et al; 1992b). Bei den Langerhanszellen in der Epidermis handelt es sich um unreife Vorstufen von antigenpräsentierenden Zellen (Romani, N. et al; 1989a). Sie beginnen zu reifen, nachdem sie Reizen, z. B. in vivo einem Kontaktallergen oder in vitro GM-CSF, ausgesetzt worden sind. Exogen zugeführtes Antigen wird am besten von unreifen Langerhanszellen aufgenommen, während gereifte Zellen am effektivsten in der Präsentation gegenüber T-Zellen sind (Romani, N. et al; 1989b). An frischen humanen Langerhanszellen wurden durchweg Birbeck-Granula und eine starke Expression von CD 1a, CD 1c und den MHC-Klasse-II-Molekülen HLA-DR, -DP und -DQ nachgewiesen (Teunissen, M. et al; 1990). Während der Kultivierung wurde die Expression von CD 1a und CD 1c merklich schwächer und die Zahl der Birbeck-Granula nahm ab. Die für die Antigenpräsentation essentiellen MHC-Klasse-II-Antigene blieben erhalten, LFA-3- und MHC-Klasse-I-Moleküle wurden sogar verstärkt exprimiert.

Auf kultivierten humanen und murinen dendritischen Zellen wird zudem die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD 80 und CD 86 beobachtet (Yokozeki, H. et al; 1996; Kawamura, T. et al; 1995). CD 80 fungiert als Kostimulator des T-Zell-Rezeptormoleküls CD 28 (Larsen, C. et al; 1992; Azuma, M. et al; 1992), CD 86 als Ligand für CTLA-4 und CD 28 (Inaba, K. et al; 1994). CD 80 und CD 86 werden nur von gereiften Zellen exprimiert. Die Produktion beider Moleküle wird durch Cytokine reguliert (Ozawa, H. et al; 1996; Kawamura, T. et al 1995; Chang, C.-H. et al; 1995). Die Hochregulation von CD 80 ist mRNA gesteuert (Girolomoni, G. et al; 1994). CD 80 und CD 86 werden nicht in situ exprimiert, ihre Expression steigt in den ersten drei

Tagen der Kultur an und bleibt bis zum sechsten Tag hoch (Kawamura, T. et al; 1995; Yokozeki, H. et al; 1996).

Die Funktion und das Verhalten von Langerhanszellen in der Kultur und in der Immunpathologie sind schon von vielen Autoren untersucht worden. Bisher wurde jedoch noch nicht geklärt, wie sich die Langerhanszellen nach der Antigenpräsentation, also nach Erfüllung ihrer primären Funktion, verhalten. Würden die Zellen verbleiben, käme es zu einer Ansammlung von Langerhanszellen in den Lymphknoten und die Lymphknoten müßten sich im Laufe des Lebens nach einer wachsenden Anzahl von Antigenpräsentationen, mit Langerhanszellen anfüllen und vergrößern. Es gibt auch keinen Anhalt dafür, daß die Zellen nach Antigenpräsentation wieder in die Haut zurückwandern: in vivo befinden sich Langerhanszellen in der afferenten Lymphe und im Lymphknoten, in der efferenten Lymphbahn sind sie jedoch nicht mehr nachweisbar (Romani, N. et al; 1992c). Langerhanszellen besitzen in der Epidermis eine lange Lebensdauer; sie können mehrere Monate in der Epidermis verbringen. In der afferenten Lymphe und im Lymphknoten ist ihre Lebensdauer jedoch nur kurz (Steinman, R. et al; 1995). Es gibt noch einen weiteren Grund dafür, daß sie sich aus dem Lymphknoten wieder entfernen müssen: sie würden sonst weiter die T-Zellen zu einer Immunantwort stimulieren, was in einer überschießenden Immunantwort resultieren müßte. Eine Akkumulation von Langerhanszellen ist pathologisch und kommt z.B. bei der Histiocytosis X vor (Lieberman, P. et al; 1996). Möglicherweise könnte die Entartung von T-Zellen beim T-Zell-Lymphom durch Langerhanszellen hervorgerufen werden, die, da sie nicht eliminiert werden, solange T-Zellen stimulieren, bis diese mutieren.

Ziel der Untersuchungen war es, die zellulären und funktionellen Eigenschaften und die Elimination von Langerhanszellen in der Zellkultur zu ermitteln. Es wurde die Anzahl viabler Zellen mittels Trypanblauausschluß zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur ermittelt. Anhand von Immuncytochemie, Elektronenmikroskopie und eines spezifischen ELISAs wurde qualitativ und quantitativ nachgewiesen, daß die Eliminierung apoptotisch verläuft.

2 Versuchsdurchführungen

Bewahrt man Haut in einem Kulturmedium auf, wandern Langerhanszellen aus der Epidermis in das Kulturmedium (Larsen, C. et al; 1990). Dieses Verhalten der Langerhanszellen kann genutzt werden, um sie für Versuche von anderen Zellen aus der Haut zu trennen.

Epidermis wurde durch Dispase von der Dermis getrennt und in Kulturmedium (RPMI++) gegeben. Die aus der Epidermis in das Medium gewanderten Zellen wurden - gesammelt.

Auf diese Weise migrierte Langerhanszellen verhalten sich phänotypisch in gleicher Weise wie Langerhanszellen in vivo nach Kontaktallergie (Rambukkana, A. et al; 1995). Das Migrationsmodell eignet sich deshalb, die Immunpathologie von Langerhanszellen nach Kontaktallergie zu untersuchen. Aufgrund dieses gleichen Entwicklungsverhaltens wird postuliert, daß sich Langerhanszellen in vitro auch auf dieselbe Weise eliminieren wie in vivo.

2.1 Isolierung und Anreicherung von Langerhanszellen

2.1.1 Versuchsprinzip

Langerhanszellen sind antigenpräsentierende Zellen in der Epidermis. Bei Antigenkontakt binden sich die Langerhanszellen an das Antigen und wandern zusammen mit diesem zu einem Lymphknoten, wo sie den dortigen T-Lymphozyten das Antigen präsentieren (Kripke, M. et al, 1990; Romani, N. et al; 1992c).

Auch in vitro wandern Langerhanszellen aus der Epidermis aus, wenn man diese in flüssigem Medium aufbewahrt (Lenz, A. et al, 1993). Da Langerhanszellen die einzigen HLA Klasse II-positiven Zellen in der Epidermis sind (Romani, N. et al; 1992a), können sie mit Dynabeads (von Dynal, s. Anhang) über positive Selektion angereichert werden. Dabei binden die magnetischen Dynabeads an HLA Klasse II-positive Zellen. So können die gebundenen Zellen mit einem Magneten von der Lösung getrennt werden. Anschließend werden die Dynabeads mit Detachabeads von den Zellen getrennt und wiederum mit einem Magneten entfernt, so daß man eine Lösung erhält, in der nur HLA Klasse II-positive Zellen enthalten sind (Morris, J., et al; 1994).

2.1.2 Versuchsdurchführung

Die Isolierung der Langerhanszellen erfolgte aus Vollhaut, welche bei Mammareduktionen entfernt wurde. Diese erhielten wir dankenswerterweise von den

Stationen der Plastischen Chirurgie der Berliner Krankenhäuser Prenzlauer Berg, dem Urban-Krankenhaus und dem Krankenhaus Waldfriede . Die Versuche wurden von der Ethik-Kommission der Charité Standort Rudolf-Virchow-Klinikums am 20.2.1996 genehmigt.

Alle Arbeiten, das Präparieren der Haut und die Experimentdurchführung, wurden unter sterilen Bedingungen an der sterilen Arbeitsbank durchgeführt, um eine Kontamination der Kultur mit Keimen zu vermeiden. Die Versuche dauerten jeweils 4 Tage.

2.1.2.1 Versuchstag 1

Die oben erwähnten Krankenhäuser erhielten Eppendorfgefäße mit dem Transportmedium, so daß die Haut noch im Operationssaal in das Medium gegeben werden konnte. Die zur Verfügung gestellte Haut wurde aus den Kliniken am Tage der Operation abgeholt.

Anschließend wurde die Haut präpariert:

1. das Fett wurde mit einer Schere entfernt,
2. die Haut wurde in ca. 5×40 mm große Streifen geschnitten,
3. gewogen,
4. in Dispase 5 mg/5 ml PBS gelegt
5. über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.1.2.2 Versuchstag 2 und 3

Die Epidermis wurde mit einer Pinzette abgezogen und

1. auf Petrischalen mit je 20 ml $RPMI^{++}$ verteilt.
2. Schließlich wurde die Epidermis im Brutschrank bei 37°C für zwei Tage aufbewahrt.

2.1.2.3 Versuchstag 4

Das Medium mit den spontan aus der Epidermis migrierten Zellen wurde abpipettiert, filtriert und zentrifugiert.
Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert und gewaschen (auch diese Arbeitsschritte erfolgten an der sterilen Werkbank).

Für die anschließende Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Waschen in 40 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl auf zwei Arten bestimmt: mit Hilfe der Neubauer-Kammer und mit dem Zell-Zähler (Beschreibung siehe „Kultur der Langerhanszellen“ ab S. 15). Aus den 40 ml Zellösung wurden insgesamt 30 µl für die Zählung entnommen.
Die Anreicherung erfolgte wiederum an der sterilen Werkbank.

Die Langerhanszellen wurden mit Hilfe von anti-HLA-DR-beschichteten magnetischen Kügelchen (Dynabeads von Dynal, s. Anhang) über positive Selektion angereichert. Dieses Prinzip wurde erstmals von Jenny Morris (Morris, J. et al 1992)

vorgestellt. Es wurde nach einer Arbeitsanweisung für die Trennung von Langerhanszellen von Jenny Morris (Morris, J. 1994) gearbeitet, die in 3 Schritten erfolgt:

1. Nach erneutem Zentrifugieren und der Entfernung des Überstandes wurden die Zellen mit so viel PBS+BSA resuspendiert, daß die Zellratio $5*10^7$ Zellen/ml PBS+BSA betrug (BSA wurde für diesen Schritt hinzugegeben, da auch die Dynabeads in der kommerziellen Lösung BSA enthielten und so die Medien ähnlicher waren.). Dieser Zellsuspension wurden 125 µl Dynabeads /ml hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend in Eis auf einem Schüttler für 30 min. inkubiert.
2. Die Zellen wurden 10mal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurden jeweils 8 ml PBS gegeben und gut geschüttelt. Anschließend wurde das Röhrchen in den Magneten gestellt. Nachdem sich die mit Dynabeads gebundenen Zellen an den Magneten angelagert hatten, wurde der Überstand abgegossen. Nach dem 10. Mal wurden 25 µl Detachabeads auf die Zellen gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.
3. Im Anschluß daran wurden 8 ml PBS hinzugeben und das Röhrchen in den Magneten gestellt. Die von den Langerhanszellen abgelösten Dynabeads sammelten sich an der dem Magneten zugewandten Seite. Im Überstand, der gesammelt wurde, befanden sich die HLA-DR-positiven Langerhanszellen. Dieser Überstand wurde in ein weiteres Reagenzglas überführt, welches wieder in den Magneten gestellt wurde, um alle Dynabeads möglichst vollständig zu entfernen. Nach Überführen in ein anderes Reagenzglas wurde der Überstand wieder in den Magneten gestellt. Dieser Schritt 3

wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der gesamte Überstand wurde gesammelt und zentrifugiert.

Bei dieser erneuten Zentrifugation sammelte sich ein Zellpellet mit den angereicherten Zellen am Boden. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert.

Im Anschluß wurde erneut die Zellzahl auf zwei Arten bestimmt:

- über die Neubauer-Kammer-Zählung
- über den Zell-Zähler

Für die Zählungen wurden den Zentrifugaten insgesamt 30 µl entnommen. Die Langerhanszellen wurden in PBS gewaschen und je nach Anforderung, d.h. für die Zeitkinetiken bzw. für den CDDE, weiterverarbeitet.

2.2 Kultur der Langerhanszellen

Der gesamte Versuch erstreckte sich vom Erhalt der Haut (Tag 1) und die Anreicherung mit Dynabeads (Tag 4) über einen Zeitraum von insgesamt bis zu 17 Tagen.

Der Tag der Anreicherung wurde als Tag 0 der Kultur definiert. Für die Untersuchungen der Langerhanszellen wurde wie folgt vorgegangen:

Die angereicherten Langerhanszellen wurden in PBS gewaschen und anschließend in $RPMI^{++}$ resuspendiert und auf 6-Loch-Gewebekulturplatten verteilt. Jede Vertiefung wurde hierbei mit 3 ml der Zellösung gefüllt. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Das Medium wurde alle 4-5 Tage gewechselt.

Der Anteil an lebenden Langerhanszellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe derTrypanblau-Ausschlußmethode ermittelt. Hierfür wurden die Zellen nach der Ernte zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen einmal in PBS gewaschen. Zum Waschen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert.

Aus dieser Zellösung wurden zwei Mal 10 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Durch Zugabe von 90 µl Trypanblau wurde eine Verdünnung von 1:10 hergestellt. Diese Verdünnung wurde jeweils auf die oberen bzw. unteren 4x4 Quadrate der Neubauer-Kammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt.

Die vitalen Zellen schlossen das Trypanblau aus, da ihre Zellmembran noch intakt war und funktionierte. Die toten Zellen waren blaugefärbt, da ihre Zellmembran nicht mehr funktionstüchtig war und deshalb das Trypanblau in die Zellen eindringen konnte. Für die Ermittlung der Zellzahlen des jeweiligen Tages wurden nur die vitalen Zellen verwandt. Die Zahl der Zellen wurde berechnet nach der Formel:

ZZ=g.v.Z.* 104* Verd.* VZL

ZZ : Zellzahl

g.v.Z.: gezählte, vitale Zellen

Verd.: Verdünnung, hier = 10

VZL : Volumen der Zellösung, aus der 2x 10 µl entnommen wurden

Zusätzlich wurde die Zellzahl mit dem Zell-Zähler "Casy 1" bestimmt. Auch hierfür wurden aus der Lösung nach dem Waschen 10 µl entnommen, diese wurden mit 10 ml PBS aufgefüllt und im Zell-Zähler gezählt.

Am Tag der Anreicherung (= Kulturtag 0) und an späteren Tagen wurden Cytos angefertigt. Die Herstellung erfolgte, indem die Zellen in PBS gewaschen und resuspendiert wurden und anschließend pro Objektträger zwei Tropfen zu je 20 µl aufgetragen wurden. Nach dem Verdunsten der PBS wurden die Proben im Kühlschrank bei -20°C gelagert.

Diese Cytos wurden für die APAAP- Färbung benutzt. Am Tag der Färbung wurden die Cytos für 10 min. in kaltem Aceton bzw. für die bcl-Gruppe der APAAP-Färbung in 2%-iger Paraformaldehydlösung fixiert.

2.3 Elektronenmikroskopie

2.3.1 Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie

Die Langerhanszellen werden zunächst fixiert und anschließend entwässert, da sie im Elektronenmikroskop einem Hochvakuum ausgesetzt sind und verbleibendes Wasser die Zellen im Vakuum zerstört hätte.

2.3.2 Fixierung der Langerhanszellen

Die Langerhanszellen wurden nach den entsprechenden Tagen Kulturdauer geerntet.

Dabei wurde der entsprechende Ansatz mitsamt dem Medium in ein Eppendorfgefäß pipettiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert. Auf diese Weise wurde noch zwei Mal gewaschen.

Ein Aliquot wurde abgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Trypanblaumethode und des Zell-Zählers bestimmt.

Nach dem zweiten Waschvorgang wurde das Zellpellet in 2 ml Karnovski-Lösung wieder aufgenommen und somit fixiert. Die Proben konnten nun bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Karnovski-Lösung setzte sich zusammen aus:

- Glutaraldehyd
- Paraformaldehyd
- M Cacodylatpuffer, ph 7,4 (aus 42,9g Cacodylsäure in 1000 ml aqua bidest)

2.3.3 Entwässerung der Langerhanszellen

Die Eppendorfgefäße mit den in der Karnovski-Lösung enthaltenen Zellen wurden mit PBS 0,1 molar aufgefüllt und in der Zentrifuge bei 1400 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, wieder mit 2 ml PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Zellen drei Mal gewaschen und anschließend wieder über Nacht in PBS im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde noch einmal das PBS gewechselt. Dann wurde nach erneuter Zentrifugation und Abgießen das Zellpellet in 2%iger Osmiumsäure aufgenommen.

Die Osmiumsäure wirkte 45 min bei Raumtemperatur ein. Danach wurden die Zellen drei Mal mit aqua dest. gewaschen.

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellen in zuvor angesetzter 2%iger Agarose aufgenommen. Die verwandte Agarose ist bei 37°C flüssig. Zum Verarbeiten wurde sie im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Die Agarose wurde in einem Mischungsverhältnis von 1:1 Agarose zur Zellsuspension gegeben.

Das in Agarose aufgenommene Zellpellet wurde für 20 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in der Agarose auf Eis gelegt, um das Präparat hart werden zu lassen. Das Präparat wurde nun entwässert. Dafür wurde es nacheinander in Pufferwaschlösungen nach dem folgenden Schema gelegt:

Pufferwaschlösung	Zeit [min]	
50% Ethanol	10	2x
70% Ethanol	10	2x
90% Ethanol	10	2x
96% Ethanol	10	3x
100% Ethanol	10	3x
Gemisch 1:1 Ethanol/Propylenoxid	15	2x
Gemisch 1:1 Propylenoxid/Araldit	15	1x

Die Zellen wurden anschließend in reinem Araldit bei Raumtemperatur über Nacht aufbewahrt.

2.3.4 Einbettung

Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung der Langerhanszellen. Dazu wurde das Zellpellet aus dem Araldit entnommen, in eine BEEM-Kapsel getan und diese mit Araldit aufgefüllt. Das Präparat wurde nun in der Wärme bei 60°C für drei Tage gehärtet.

2.3.5 Schneiden der Präparate

Die BEEM-Kapseln wurden in das Ultramikrotom eingespannt, und es wurden zunächst Semidünnschnitte von 150-190 nm Dicke angefertigt. Danach wurden Ultradünnschnitte von 70-80 nm hergestellt.

Die Schnitte wurden auf Grids aufgefangen und anschließend mit Uranylacetat für 15 min kontrastiert.

Es wurde mit aqua dest. gespült und erneut mit Bleicitrat für 5 min. kontrastiert. Im Anschluß daran wurden die Schnitte wieder mit aqua dest. gespült.

2.4 Immuncytochemie unter Verwendung der APAAP-Technik

2.4.1 Versuchsprinzip

Die Färbung mit der Methode „Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase“ (APAAP) wird für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Oberflächenmarkern benutzt. Hierbei wird mittels Antikörpern, die sich aneinander binden, eine Struktur geschaffen, die anfärbbar ist. Durch dieses Verfahren kann die Anwesenheit spezifischer Oberflächenmarker nachgewiesen werden.

In unseren Versuchen arbeiteten wir mit monoklonalen Antikörpern von der Maus , die sich spezifisch an bestimmte Oberflächenmarker binden, z.B. anti-CD 1a von der Maus an das CD 1a der Langerhanszellen (Die Liste der untersuchten Antikörper ist auf Seite 24f).

Anschließend wurde dieser gebundene Maus-Antikörper mit einer Anti-Maus-Kalb-Brücke an eine intestinale Phosphatase des Kalbes und an diese wiederum die anti-alkalische-Phosphatase der Maus gebunden werden. Durch diese Aneinanderbindung von alkalischer-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase entsteht, wenn Oberflächen-marker vorhanden sind, eine anfärbbare Struktur (Cordell, J. et al; 1984). Es wurde in drei Inkubationszyklen gearbeitet.

1. Im ersten Schritt wurde zunächst der primäre monoklonale Antikörper an den Oberflächenmarker gebunden.

2. Im zweiten Schritt wurde Anti-Maus-Ig an den Antikörper gebunden, an welches sich im dritten Schritt der APAAP-Komplex band. Die derart markierten Zellen konnten nun mit hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung visualisiert werden.
3. Abschließend wurde mit Mayers-saurer-Hämalaunlösung gegengefärbt.

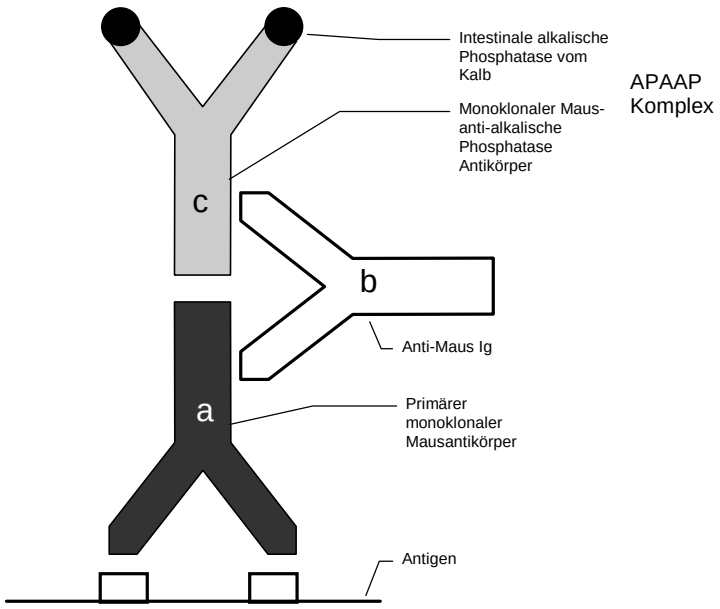


Abbildung 1: Schematische Darstellung der APAAP-Technik

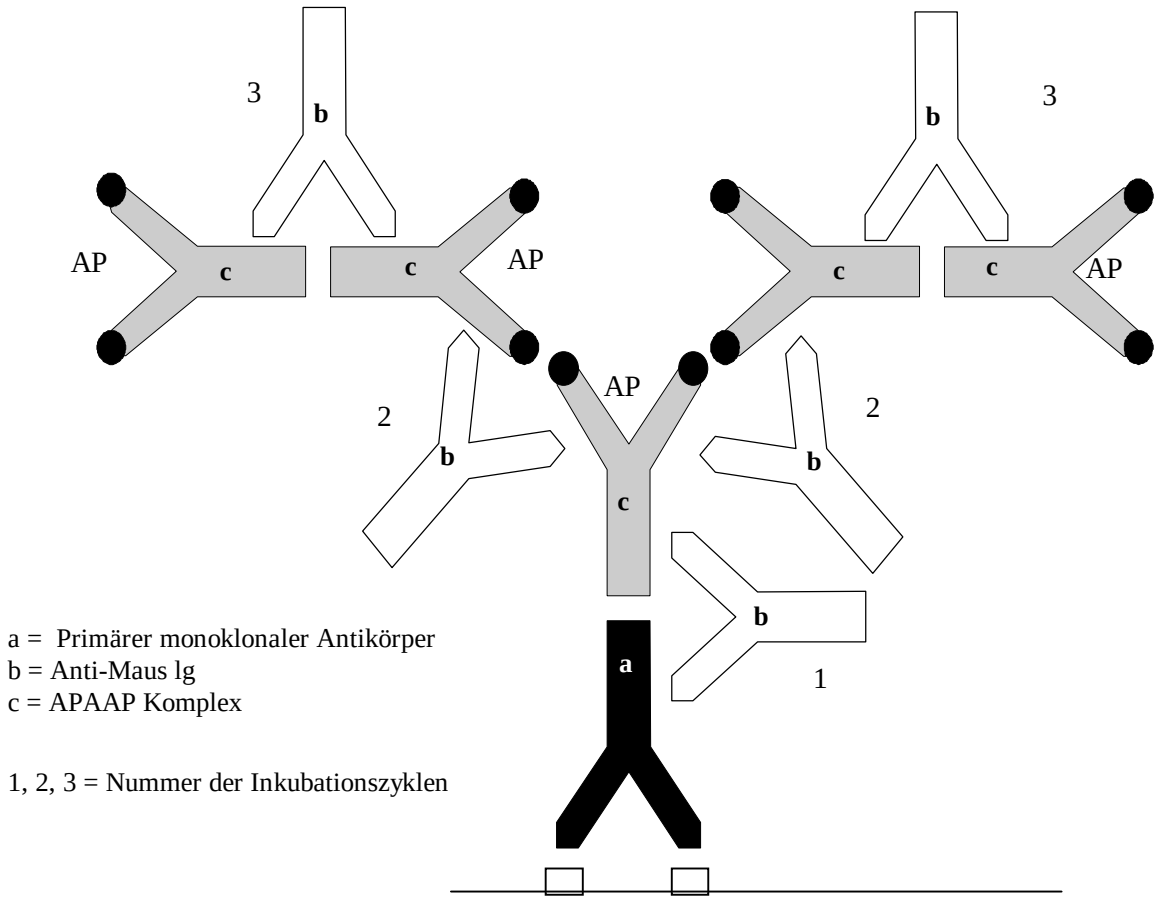


Abbildung 2: Schematisches Diagramm der amplifizierten APAAP-Technik

Abbildungen aus: C. Wesendahl, Arbeitsanweisung für den APAAP

2.4.2 Versuchsdurchführung

Die im Tiefkühler gelagerten Cytos wurden zur Fixation für 10 min in kaltes Aceton getaucht. Für die Inkubation mit bcl-2 vorgesehene Cytos wurden für 10 min in Paraformaldehydlösung fixiert.

Die entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper wurden mit dem Verdünnungsmedium (I) hergestellt und auf die Cytos pipettiert. In der feuchten Kammer wurde nun für 30 min. inkubiert.

Danach wurde mit TBS mehrmals gewaschen.

Es erfolgte nun die Inkubation mit Mausimmunoglobulin als Brückenantikörper für 30 min. Das Mausimmunoglobulin wurde mit dem Verdünnungsmedium (II) 1:40 verdünnt.

Es wurde wieder mehrmals in TBS gespült.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Komplex. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:40 mit dem Verdünnungsmedium (II) aufgetragen und für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert.

Es erfolgte eine jeweils zehnminütige Wiederholung der letzten beiden Schritte. Nach jedem Schritt wurden die Objektträger in TBS gespült.

Anschließend wurden die Proben mit hexazotierter Astraneufuchsinlösung entwickelt. Die Lösung wurde frisch hergestellt, danach wurden die Objektträger in der Lösung für 30 min auf einen Schüttler gestellt.

Die Proben wurden wieder mit TBS gespült, dann erfolgte für 10 min eine Gegenfärbung mit Mayers-saurem-Hämalaun. Nach Spülung in TBS wurden die Objektträger bis zur Eindeckelung mit Kaisers Glyceringelatine in Leitungswasser aufbewahrt.

Liste der Antikörper (die verwendeten Verdünnungen wurden zuvor durch Austitration ermittelt):

Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller	Expression
CD 1a	NA 1/34	IgG2a, kappa	1:100	DAKO, Hamburg, Deutschland	kortikale Thymozyten, Langerhanszellen, dendritische Zellen
HLA-DR	DK 22	IgG2a, kappa	1:100	DAKO Hamburg Deutschland	Haupthistokompati-bilitätskomplex auf menschlichen Zellen
CD 95 (Fas)	DX 2	IgG_1, kappa	1:2500	PharMingen, Hamburg, Deutschland	Apoptosemarker auf vielen Zellreihen
CD 95-L (Fas Ligand)	NOK-1	Maus IgG_1	1:20	PharMingen, Hamburg, Deutschland	bindet an CD 95 und sorgt damit für die Aktivierung
CD 80 (B7-1)	BB 1	Maus IgM	1:500	Calbiochem, San Diego, USA	B-Zellen und Unterarten, agiert als Kostimulant von CD 28 und CTLA-4
CD 86 (B70/B7-2)	IT2.2	Maus IgG_{2b}, kappa	1:500	PharMingen, Hamburg, Deutschland	Monocyten, aktiv.B-Zellen, dendr. Zellen; zweiter Ligand für CD 28 und CTLA-4
bcl-2	100/D5	IgG_1, kappa	1:20	ZYMED, San Francisco USA	funktioniert als Inhibitor von Apoptose
bcl-xl(Ab-1)	k.A.= keine Angabe	Kaninchen IgG	1:20	Calbiochem	mit bcl-2 verwandt, funktioniert als Regulator von Apoptose
bax(Ab-1)	k.A.	polyklonales Kaninchen IgG	1:10	Oncogene	bindet an bcl-2 und fördert Apoptose

Die APAAP-Färbungen wurden quantitativ und qualitativ ausgewertet. Für die quantitative Auswertung wurden jeweils drei Mal 100 Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt und der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen bestimmt. Dabei wurde gleichzeitig für die Expressionsstärke folgende semiquantitative Einteilung benutzt:

– = keine
(+) = schwache
+ = leichte
++ = starke
+++ = sehr starke Anfärbung.

Diese Einteilung gibt über die Stärke der Antigenexpression Auskunft.

2.5 Cell Death Detection ELISA (CDDE)

2.5.1 Versuchsprinzip

Bei der Apoptose wird der DNA-Strang durch eine spezifische Endonuclease gespalten. Diese Ca^{2+}- und Mg^{2+}- abhängige Endonuclease spaltet den DNA-Doppelstrang in den leicht zugänglichen Linker-Regionen zwischen den Nucleosomen in Mono- und Oligonucleosome. Die DNA in den Nucleosomen hingegen ist mit den Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 eng assoziiert und dadurch vor der Spaltung durch die Endonuclease geschützt. Aus diesem Grund ist nach Extraktion und Separation der DNA die für die Apoptose typische „DNA-Leiter“ im Agarose-Gel zu erkennen. Es spalten sich hierbei Stücke in diese spezifischen DNA-Fragmente und können nachgewiesen werden. Das quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung von zwei monoklonalen Maus-Antikörpern gegen DNA und Histon (H2A, H2B, H3 und H4) dient als Basis für den CDDE. Es ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonucleosomen in der cytoplasmatischen Fraktion von Zellysaten.

Der Test beinhaltete drei Inkubationsschritte:

1. Zunächst wurde Anti-Histon adsorptiv an die Wand der Mikrotitermodule fixiert und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Wand mit Inkubationspuffer, der hierbei als Blockierungslösung fungiert, abgesättigt.

2. Die in der Probe enthaltenen Nucleosome wurden im zweiten Inkubationsschritt über ihren Histon-Anteil von dem an der Wand immobilisierten Anti-Histon gebunden.
3. Im dritten Inkubationsschritt band Anti-DNA-Peroxidase an den DNA-Anteil der Nucleosome. Das nichtgebundene Peroxidase-Konjugat wurde ausgewaschen und der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)] (=ABTS) als Substrat photometrisch bestimmt.

2.5.2 Probenvorbereitung

Die Proben wurden entnommen, für 8 min bei 2500 U/min zentrifugiert und einmal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 2500 U/min wurde das Zellpellet in 300 µl Inkubationspuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde für 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200 µl entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Die Proben wurden bei der Weiterverarbeitung im CDDE so aliquotiert, daß die Proben jeweils auf $2*10^4$ Zellen eingestellt waren.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung dauerte zwei Tage.

2.5.3.1 Versuchstag 1

Für die Vorbeschichtung wurde jede Vertiefung des Mikrotiterplattenmoduls mit 100 µl Beschichtungslösung gefüllt. Das Mikrotiterplattenmodul wurde mit der Abdeckfolie dicht abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.5.3.2 Versuchstag 2

Die Beschichtungslösung wurde durch Ausklopfen sorgfältig entfernt. Als Nachbeschichtung wurde jeweils 200 µl Inkubationspuffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplattenmodule pipettiert, die Module abgedeckt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde durch Ausklopfen entfernt und die Vertiefungen dreimal mit 250 µl Waschlösung gespült.

Schließlich wurden jeweils 100 µl der Probelösungen in die Vertiefungen pipettiert. Zur Bestimmung eines Leerwertes wurden in einige Vertiefungen 100 µl Inkubationspuffer gegeben. Nach Abdeckung mit Folie wurde nun für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen wieder ausgeklopft und dreimal mit Waschlösung gewaschen.

Im nun folgenden Schritt wurden für die Inkubation mit der Anti-DNA-Peroxidase 100 µl der Konjugatlösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplattenmodule pipettiert, die nicht zur Leerwertbestimmung diente. Die Module wurden abgedeckt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen wie oben ausgeklopft und gewaschen.

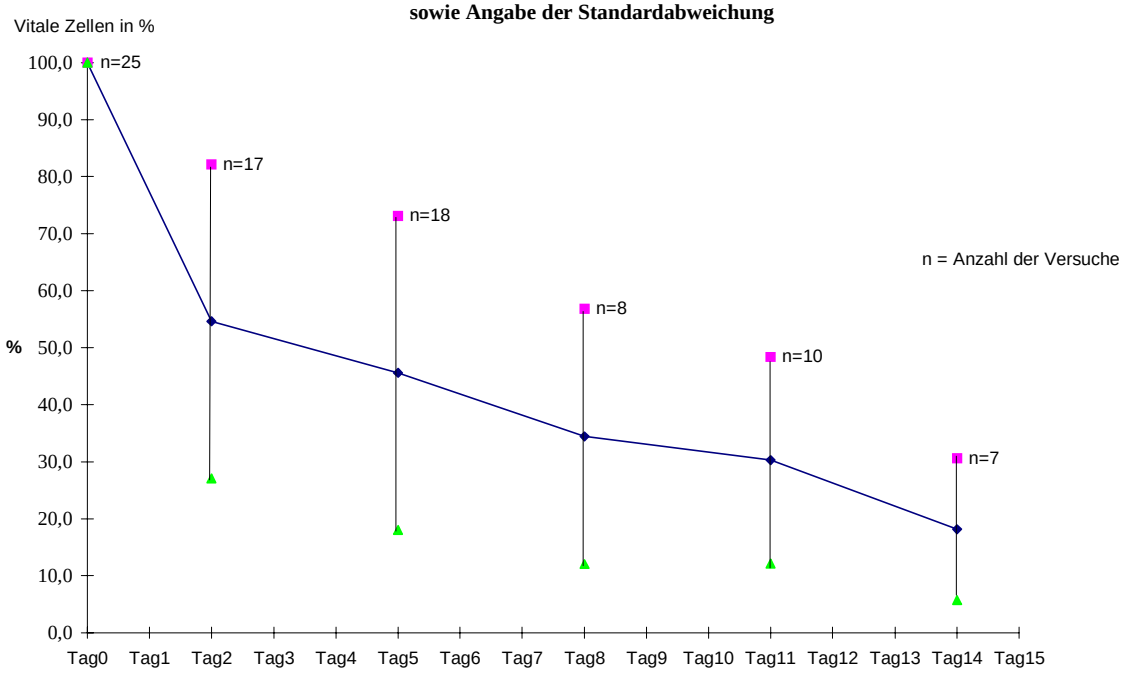
Danach wurde die Substratreaktion durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 µl der Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert und bis zur ausreichenden Farbentwicklung für eine fotometrische Messung inkubiert. Die Messung wurde nach 20 min durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitverlauf der Viabilität der Langerhanszellen in der Kultur:

Die nach Isolierung und Anreicherung erhaltenen Zellsuspensionen enthielten 91,5±6,5% CD1a-positive Zellen. Bei den Zählungen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt und der prozentuale Anteil zu der am Tag 0 der Kultur in den einzelnen Ansatz pipettierten Zellzahl errechnet. Der Verlauf der Vitalität ist in Diagramm 1 dargestellt. Es zeigte sich, daß die Zahl der viablen Zellen innerhalb der ersten zwei Tage der Kultur um mehr als die Hälfte sank. Während der folgenden Tage der Kultur nahm die Zahl der lebenden Zellen weiter ab, jedoch langsamer als zu Beginn, von im Mittel 39% am Tag 2 auf ca. 20% um Tag 10.

Diagramm 1: Vitalität der Langerhanszellen *in vitro* sowie Angabe der Standardabweichung



Es wurde zusätzlich bei der Zählung mit der Neubauer-Kammer die Zahl der viablen Zellen (d.h. die Zellen, die das Trypanblau ausschlossen) zu der gesamten Anzahl der zu diesem Zeitpunkt zu zählenden Zellen (d.h. die gefärbten und die ungefärbten Zellen) in Verhältnis gesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, daß zwischen 65% vitale Zellen zu Beginn und ca. 40-60% vitale Zellen zu späteren Zeitpunkten in der Lösung waren.

Der prozentuale Anteil der toten Langerhanszellen in der Lösung stieg nicht an, da die toten Zellen bei den alle fünf Tage erfolgten Medienwechseln entfernt wurden.

3.2 Qualitativer Nachweis der Apoptose durch Elektronenmikroskopie

3.2.1 Beschreibung der Bilder

Ultrastrukturell weist die Langerhanszelle einen unregelmäßig eingefalteten Kern auf, sie enthält keine Tonofilamente. Man kann Lysosomen, Mitochondrien und rauhes endoplasmatisches Retikulum erkennen. Zeichen der Aktivierung einer Langerhanszelle sind eine Vergrößerung der Zelle und des Nucleus, eine Zunahme von regulären Mitochondrien, Golgiapparaten und endoplasmatischen Membranen (Kolde, G. et al; 1987).

Bild A zeigt eine migrierte Langerhanszelle mit Zeichen der Aktivierung. Die Zelle besitzt einen großen, angeschwollenen Kern. Im Cytoplasma der Zelle sind Birbeck-

Granula zu erkennen. Die Zelle besitzt dendritische Ausstülpungen der Plasmamembran.

Abbildung B zeigt eine Langerhanszelle nach mehrtägiger Kulturdauer. Die Zelle ist insgesamt kleiner und ihre dendritischen Ausstülpungen sind ausgeprägter geworden. Es lassen sich aber immer noch Birbeck-Granula erkennen.

Diese Veränderungen sind auch in Bild C sichtbar: es zeigen sich große Anteile an Mitochondrien. Ebenfalls sind große Anteile von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum zu erkennen. Im Cytoplasma sind Birbeck-Granula zu erkennen.

Histologisch zeigt eine apoptotische Zelle ein charakteristisches Cytosol und Chromatinkondensation mit Schrumpfung der gesamten Zelle (Kolde, G. et al; 1993). In der Ultrastruktur ist eine frühzeitig beginnende Chromatinkondensation mit einer Randständigkeit des Chromatin sichtbar.

Nach 7 Kulturtagen waren die Langerhanszellen kleiner und ausgeprägter dendritisch geformt als frisch isolierte Zellen. Der Nucleus zeigte auffallende Eindellungen und die Anzahl der cytoplasmatischen Organellen und Birbeck-Granulas war gesunken. Hingegen war die Zahl der Lysosomen angestiegen. Es konnte während der Kultur keine Langerhanszelle in Mitose gezeigt werden.

Bild D zeigt eine apoptotische Langerhanszelle. Die Zelle besitzt einen großen, abgeschnürten Kern, in dem sich das Chromatin verdichtet hat. Dies ist eine Aufnahme von einer Langerhanszelle in fortgeschrittener Apoptose.

Unter dem Elektronenmikroskop zeigten diese Zellen die typische Schrumpfung der Zellmembran, Kondensation des Cytoplasmas und der Organellen, Absonderung des

zusammengedrängten Chromatins, sowie letztendlich die Abschnürung dieser zu Apoptosekörpern. Auf Bild E ist ein apoptotisches Fragment einer Langerhanszelle mit abgeschnürten Apoptosekörpern zu sehen. Es waren einzelne Birbeck-Granula zwischen den Apoptosekörpern zu erkennen, durch die diese Zellen als Langerhanszellen identifiziert werden konnten.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Bilder

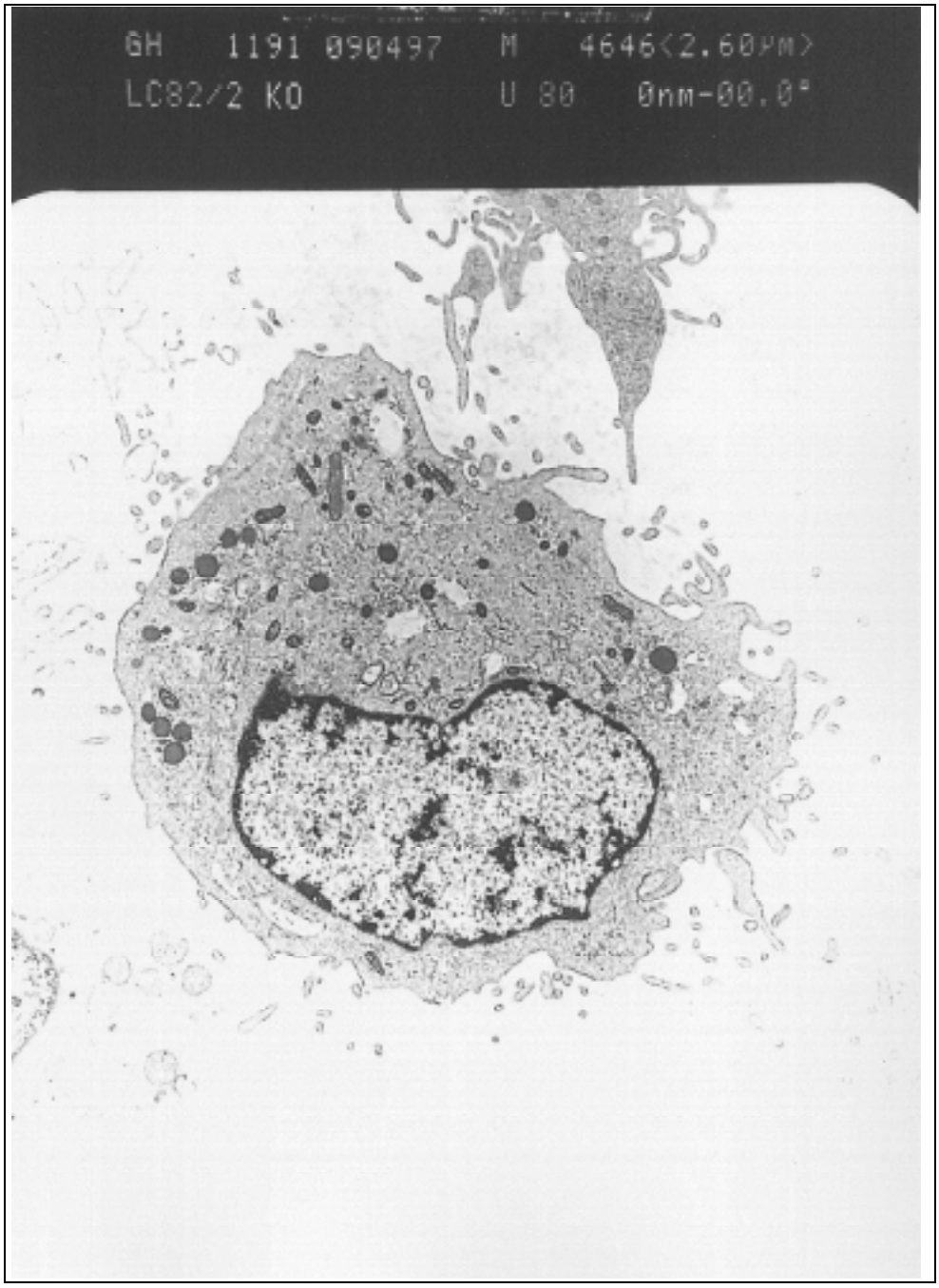


Bild A: Frisch migrierte Langerhanszelle
Vergrößerung: 6969×

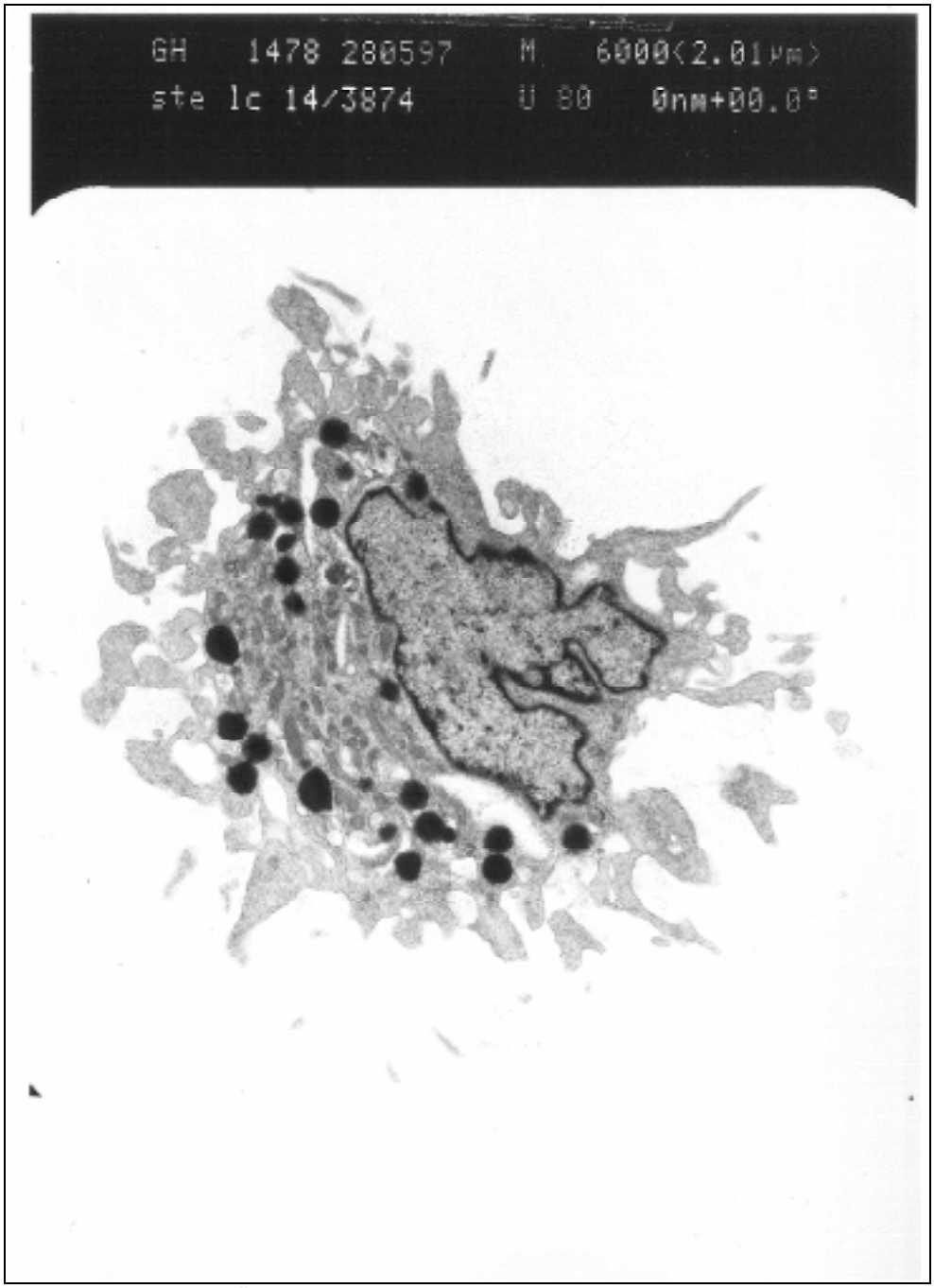


Bild B: Überlebende Langerhanszelle in längerer Kultur
Vergrößerung: 9000×

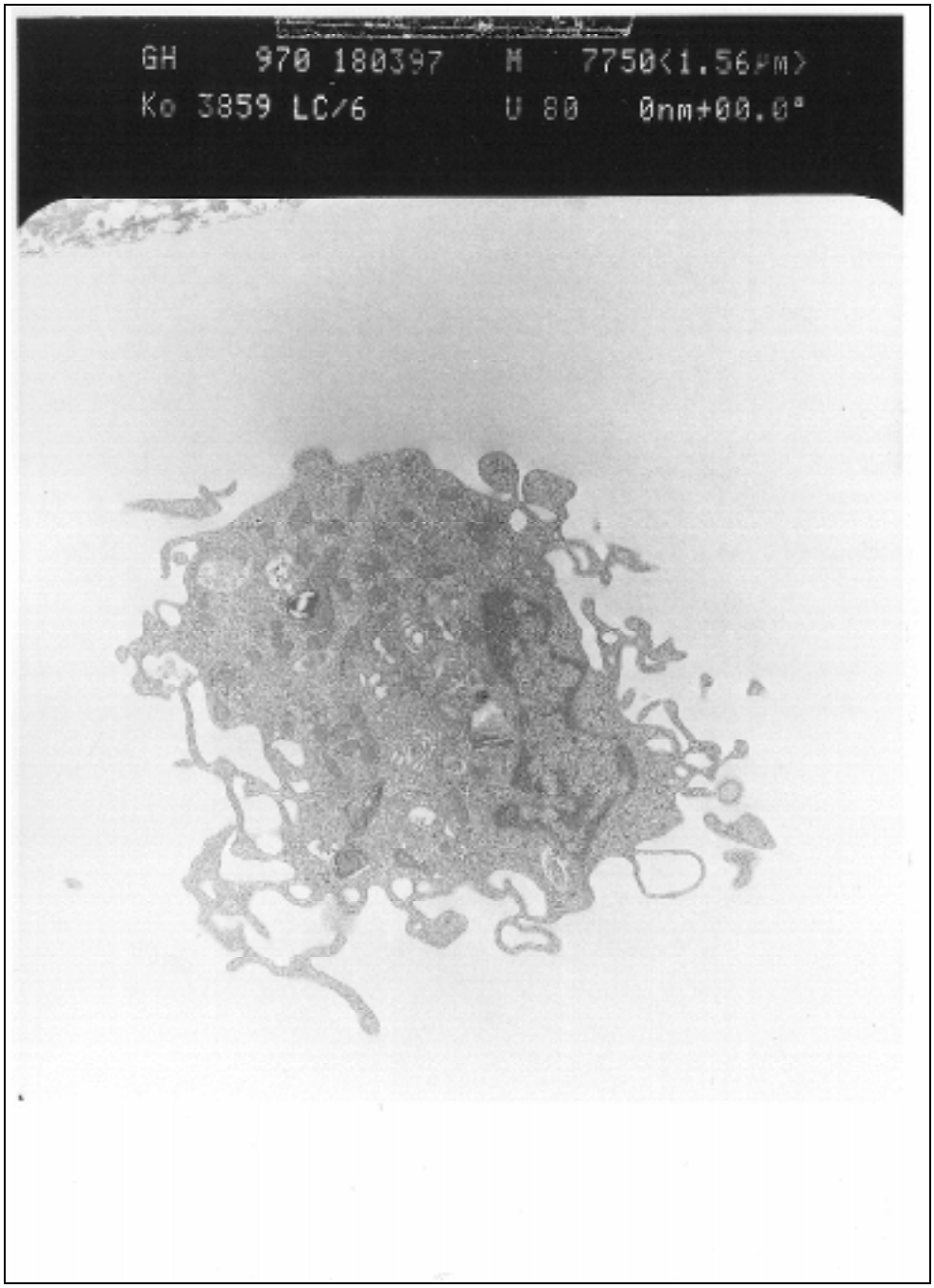


Bild C: Initiale Apoptose bei einer Langerhanszelle
Vergrößerung: 11625×

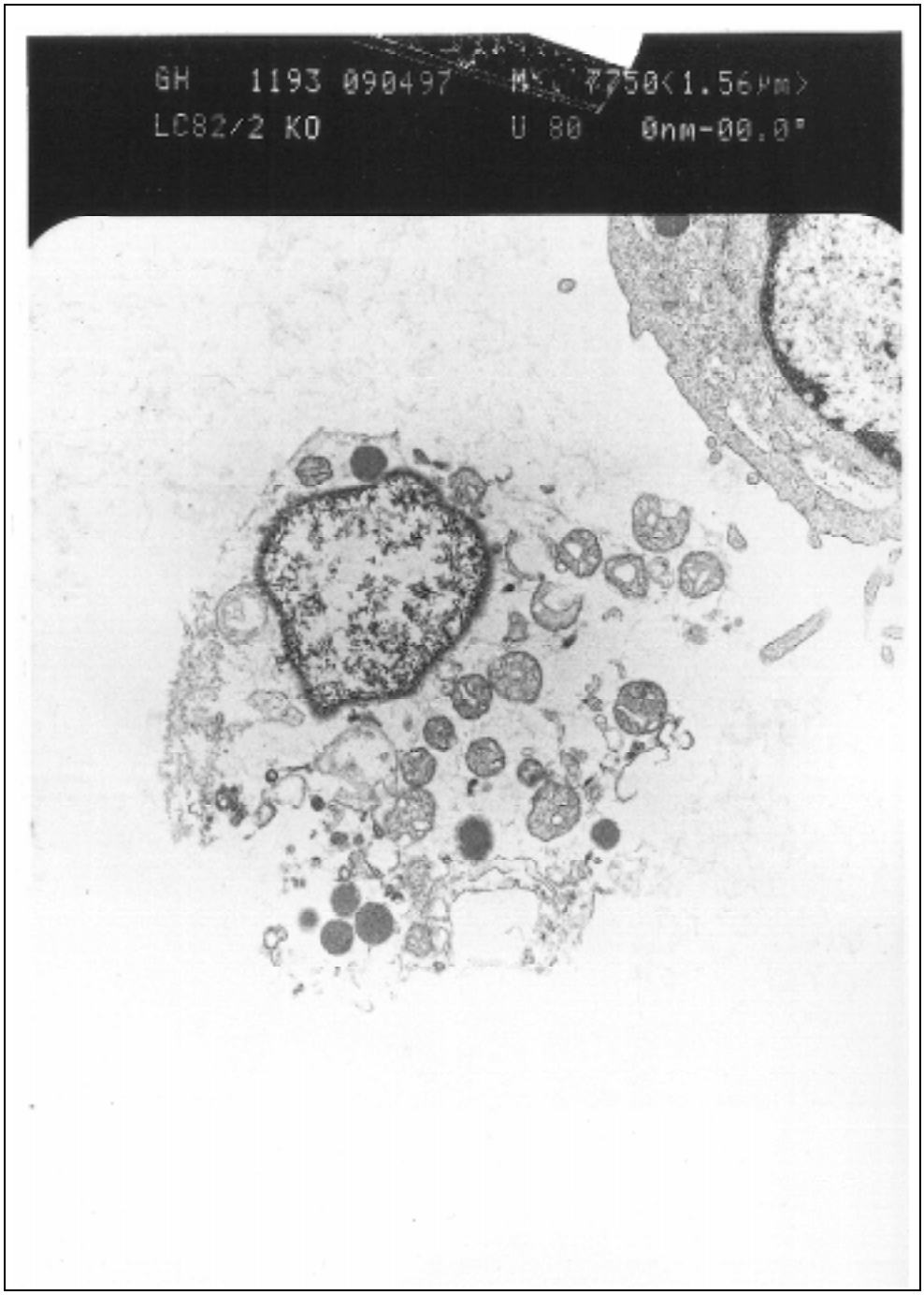


Bild D: Fortgeschrittene Apoptose bei einer Langerhanszelle
Vergrößerung: 11625×

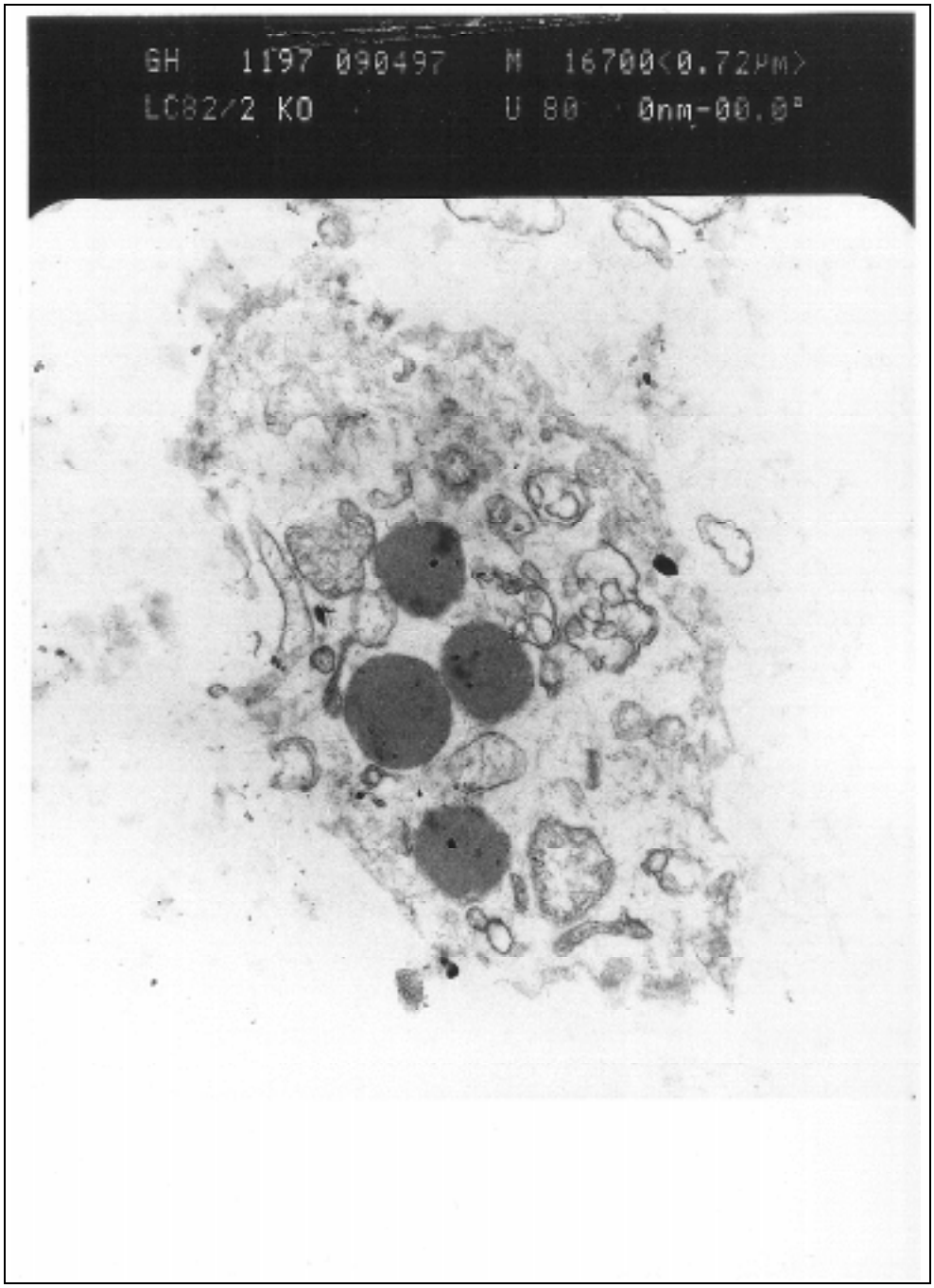
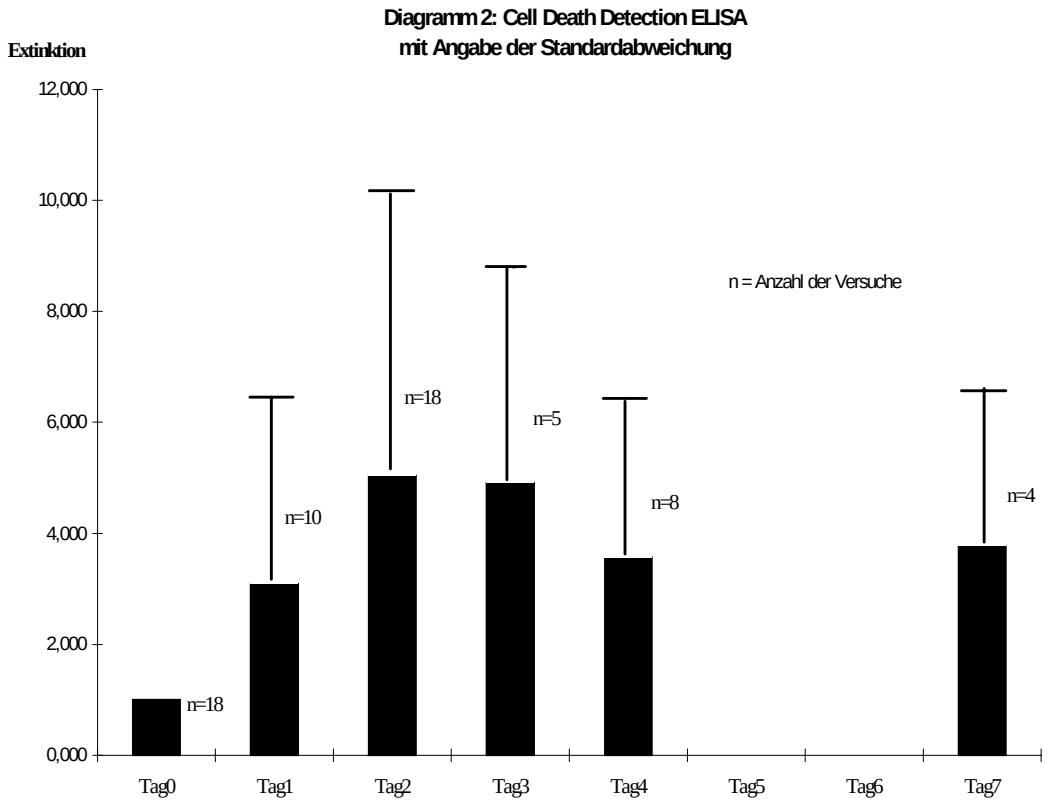


Bild E: Apoptotisches Fragment einer Langerhanszelle
Vergrößerung: 25050×

3.3 Nachweis und quantitative Bestimmung der Apoptose von Langerhanszellen

Bei den Apoptoseuntersuchungen mittels CDDE zeigten die kultivierten Langerhanszellen die biochemischen Eigenschaften des Zelltodes durch Apoptose. Bei der Apoptose findet biochemisch eine Spaltung der DNA durch endogene Nucleasen in charakteristische Bruchstücke von bis zu 185 Basenpaaren statt. Diese Bruchstücke können mittels CDDE nachgewiesen werden. Anhand des CDDE-Versuches konnte auch die Menge des Untergangs von Zellen durch Apoptose quantifiziert werden, da sich der CDDE sowohl für den qualitativen als auch den quantitativen Nachweis von Apoptose eignet.



Im CDDE konnte eine Zunahme von spontaner DNA-Fragmentation nach zwei bis drei Tagen der Zellkultur beobachtet werden. Die Anzahl der DNA-Fragmentationen war zu späteren Zeitpunkten der Kultur wieder geringer. Somit konnte ein großer Anteil an Zellen beobachtet werden, der zu Beginn der Kultur durch Apoptose gestorben ist, während dann die Zahl der Zellen langsamer abnahm (siehe dazu Diagramm 2).

3.4 Immuncytologische Untersuchungen

Die Mittelwerte der Auszählungen der APAAP-Färbungen und die qualitative Schätzung der Stärke der Färbung (Expression) der Cytos von Tag 0, dem Tag der Anreicherung, von Tag 5 und Tag 10 der Kultur sind in Tabelle 1 dargestellt:

Antikörper	Tag 0 MW/ %	Abw./ %	Expr.	n	Tag 5 MW/ %	Abw./ %	Expr.	n	Tag 10 MW/ %	Abw./ %	Exp	n
CD 1a	91, 5	±6, 5	+++	14	81, 5	±9, 8	++	10	82, 0	±9, 0	+	5
HLA-DR	85, 4	±13, 3	+++	7	94, 0	±7, 8	++	6	88, 3	±11, 0	++	4
CD 80	68, 3	±20, 1	+	7	17, 5	±13, 9	(+)	6	10, 2	±6, 3	(+)	6
CD 86	59, 1	±19, 3	+/++	8	41, 3	±17, 1	+++	7	26, 5	±18, 1	+	4
CD 95	41, 9	±25, 7	++	17	19, 0	±27, 3	+	8	11, 7	±11, 6	(+)	4
CD 95-L	45, 7	±32, 3	+	7	27, 3	±23, 6	(+)/+	4	8, 5	±2, 1	(+)	2
bcl-2	49, 6	±31, 8	+	8	22, 0	±10, 3	(+)/+	6	10, 3	±7, 8	+	3
bcl-xl	77, 6	±18, 6	++	5	39, 3	±21, 4	+/++	7	35, 7	±16, 3	(+)	3
bax	78, 6	±12, 6	++	5	43, 0	±21, 9	+/++	7	59, 8	±7, 8	+	4

Tabelle 1

n=Anzahl der in der Auswertung benutzten Versuche

– = keine

(+) = schwache

+ = leichte

++ = starke

+++ = sehr starke Anfärbung

Die Standardabweichung berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Frisch isolierte Langerhanszellen zeigten eine starke HLA-DR-Expression, die auch im Verlauf der Kultur stark blieb. Bei der semiquantitativen Beurteilung der Expression zeigte sich, daß die HLA-DR-Expression zu Beginn sehr stark war und dann im Verlauf etwas schwächer wurde. Die Expression insgesamt blieb aber stark.

Im Vergleich der Expressionen, die durch die Stärke der Anfärbung semiquantitativ beurteilt wurden, zeigten sich die der Kostimulationsmoleküle CD 80 und CD 86 nur mäßig stark. Diese wurde im Verlauf der Kultur noch schwächer. Bei diesem Vergleich zeigte sich beim CD 80 nur schwache bis gerade noch erkennbare Anfärbung. Die Expression von CD 86 war unterschiedlich stark, jedoch durchweg stärker als die von CD 80.

Die Apoptose-Marker CD 95 und der dazugehörige Ligand CD 95-L zeigten zunächst mittelstarke und dann abfallende Expression. Dies traf auch für die semiquantitative Beurteilung zu: die Expression war zu Beginn leicht bzw. stark (CD 95) und nahmen dann im Verlauf der Kultur ab.

Der Apoptose-Gegenspieler bcl-2 zeigt im Zeitverlauf eine abfallende Kurve. Die Stärke der Expression ist während des gesamten Verlaufes nur leicht.

Der Anteil der Zellen, die die zur bcl-2-Gruppe gehörenden Oberflächenmarker bcl-xl und bax besitzen, ist zu Beginn recht groß und nimmt dann ab. Die Expression dieser beiden Oberflächenmarker ist zu Beginn relativ stark und im Zeitverlauf abnehmend.

3.4.1 APAAP-Färbungen-Bilder

3.4.1.1 Durchführung der Fotografien

APAAP-Färbungen der Zellen von Tag 1, Tag 7 und Tag 12 der Kultur wurden mit dem Lichtmikroskop fotografiert. Es wurde eine Kamera benutzt, die auf das Zeiss-Lichtmikroskop aufgesetzt wurde. Desweiteren wurde ein T 64 Kodak Kunstlichtfilm verwendet. Es wurden Aufnahmen bei 1000facher Vergrößerung gemacht.

3.4.1.2 Beschreibung der Bilder

Zu den verschiedenen Zeitpunkten ist die Färbbarkeit mit den ausgewählten Oberflächenmarkern dargestellt. Bei Anwesenheit der Oberflächenmarker färben sich die Zellen bei der APAAP-Färbung mit den entsprechenden Antikörpern in einem leuchtenden purpur- bis bräunlichrotem Ton. Es wurden Färbungen mit Antikörpern gegen CD 1a, HLA-DR, CD 95, CD 95-L, CD 86, CD80, bcl-2, bcl-xl und bax durchgeführt.

Zum Vergleich zu den nachfolgenden Färbungen zeigt Bild 1 den Tag 1 eines Leerversuches. Die Zellkerne sind dunkelblau gefärbt durch die Färbung mit Mayer's-Hämalaun, aber das Zytosol zeigt nicht die typische starke rosa-bräunliche Verfärbung, wie bei einer positiven APAAP-Färbung. Auf Bild 2 ist die stark positive Färbung bei Anwesenheit des HLA-DR-Oberflächenmoleküls zu sehen.

Bild 3 zeigt CD 1a -positive Zellen am ersten Tag der Kultur. Die Zellen sind stark angefärbt, in der qualitativen Auswertung ist dies +++ = sehr starke Anfärbung (vgl. S. 36). Die Zellen besitzen einen Kern und runde Form. Zarte, schleierhafte dendritische Ausläufer der Zellen sind erkennbar. Im Vergleich dazu erscheinen die CD 1a-positiven

Zellen an Tag 7 auf Bild 4 nicht ganz so kräftig angefärbt. Die dendritische Form der Zellen hat zugenommen, die Zellen wirken wie ausgefranst. Auf Bild 5, CD 1a-positive Zellen nach zwölf Kulturtagen, ist nur bei einer Zelle ein Zellkern angeschnitten. Der Rand der Zellen ist eingezogen und in einigen Teilen der Zellen wirkt das Zytoplasma dichter als in den übrigen. Die Zellen erscheinen nach zwölftägiger Kulturdauer insgesamt etwas kleiner als auf den Bildern an Tag 1 und 7.

Bei den folgenden Bildern wurden die Zellen nach Tag 1 der Kultur geerntet und die Färbungen durchgeführt. Bild 6 und Bild 7 zeigen, daß die Zellen CD 80 und CD 86 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ebenso sind die Zellen positiv für bcl-2 (Bild 8), bcl-xl (Bild 9) und bax (Bild 10). Die Zellen erscheinen bei allen Färbungen im Laufe der Kulturdauer kleiner als zu Beginn. Auf dem Bild nach 12 Tagen Kulturdauer sind mehr Zellen sichtbar, bei denen der Zellkern nicht angeschnitten wurde.

Deutlich positiv sind auch die Färbungen von CD 95 und CD 95-L, den Apoptosemarkern. Die CD 95-Färbung am 1. Tag (Bild 11), 7. Tag (Bild 12) und 12. Tag (Bild 13) zeigen zu allen Zeitpunkten von der Intensität der Farbe eine qualitativ gleich starke Färbung. Eine kräftige Färbung zeigt sich auch für CD 95-L, wie hier an Tag 1 auf Bild 14 (5/27) gezeigt.

3.4.1.3 Fotografien

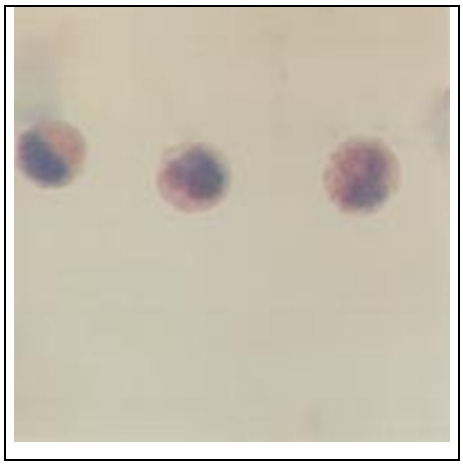


Bild 1

Leerversuch Tag 1

Vergr. 1000×

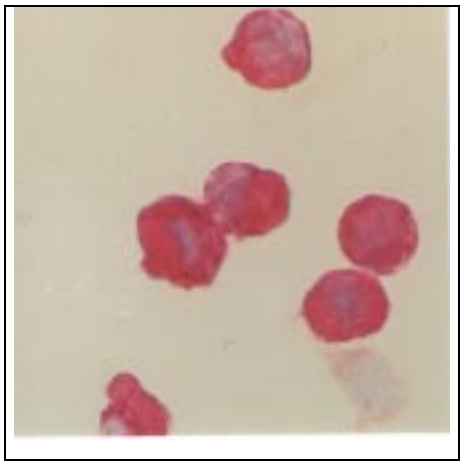


Bild 2

HLA-DR Tag 1

Vergr. 1000×

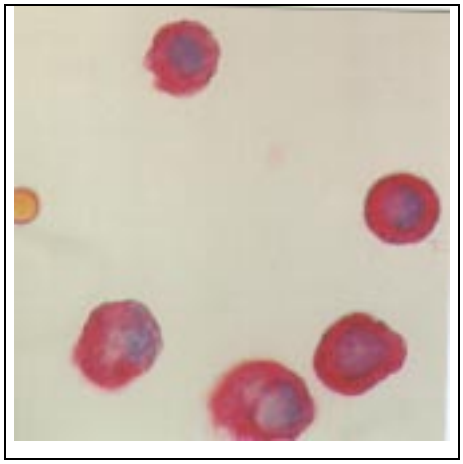


Bild 3

CD 1a Tag 1

Vergr. 1000×

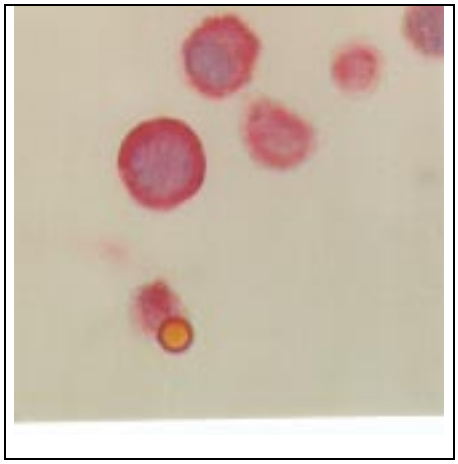


Bild 4

CD 1a Tag 7

Vergr. 1000×

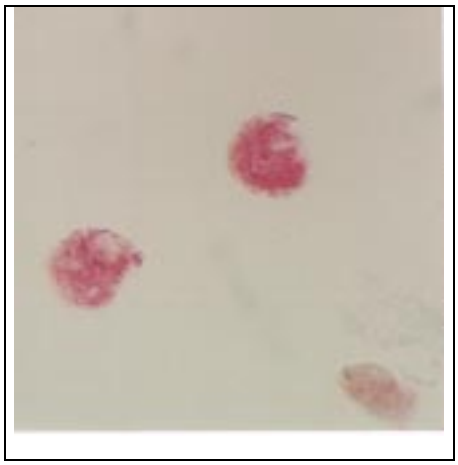


Bild 5

CD 1a Tag 12

Vergr. 1000×

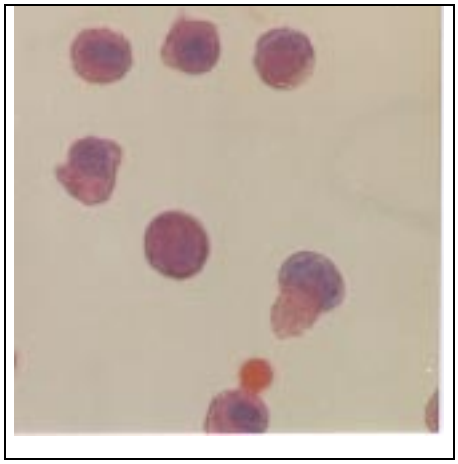


Bild 6

CD 80 Tag 1

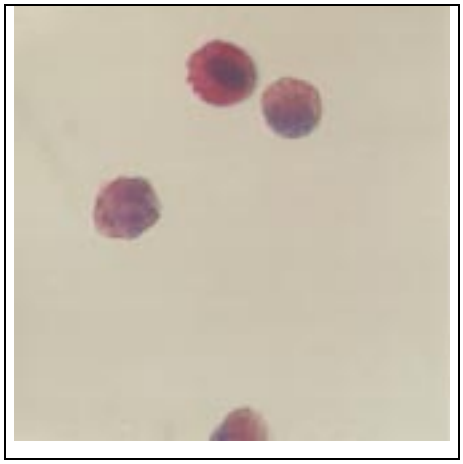


Bild 7

CD 86 Tag 1

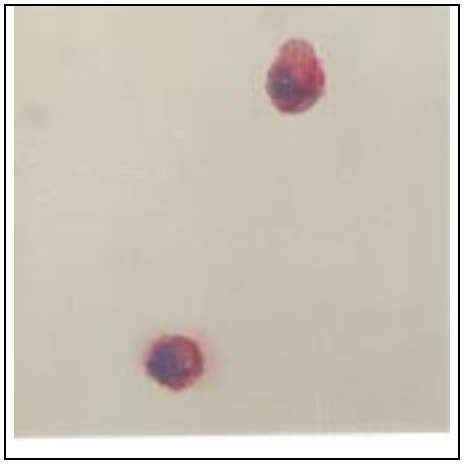


Bild 8

bcl-2 Tag 1

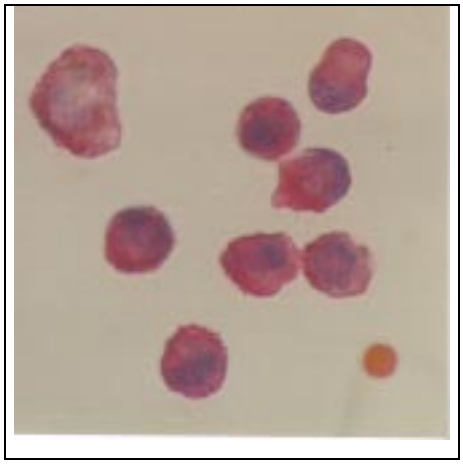


Bild 9

bcl-xl Tag 1

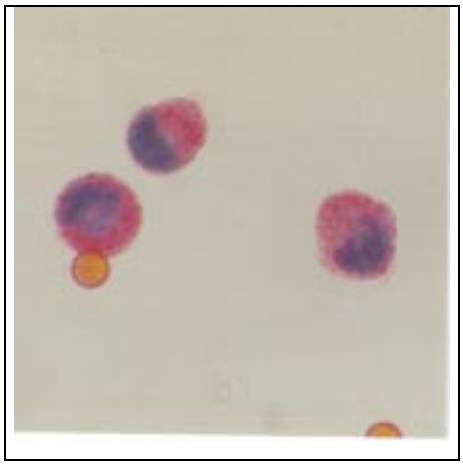


Bild 10

bax Tag 1

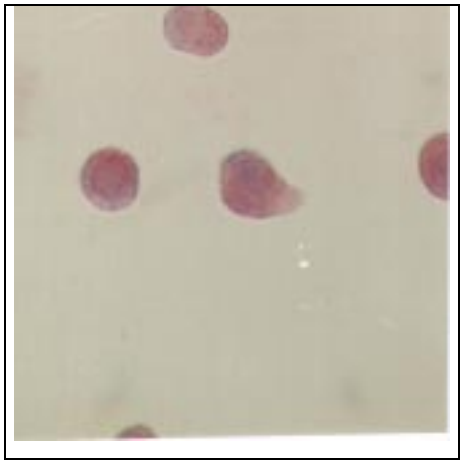


Bild 11

CD 95 Tag 1

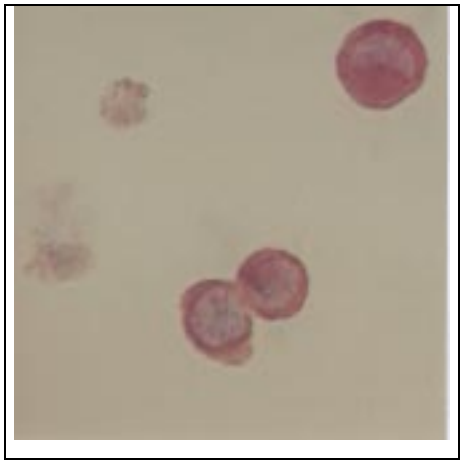


Bild 12

CD 95 Tag 7

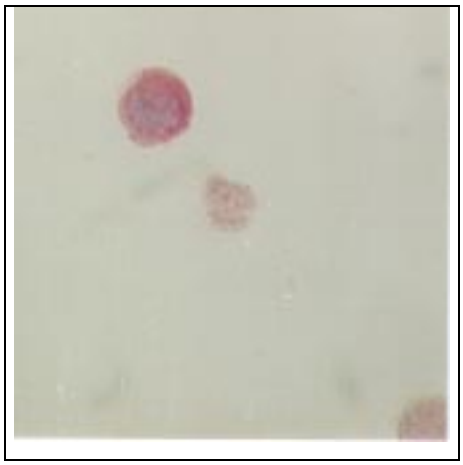


Bild 13

CD 95 Tag 12

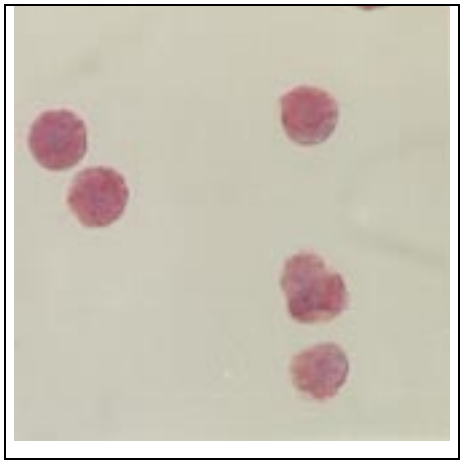


Bild 14

CD 95-L Tag 1

4 Diskussion

Für die Isolierung von intraepidermalen Langerhanszellen sind prinzipiell zwei verschiedene Verfahren bekannt: Dichtegradientzentrifugation und Migration. Bei der in der Literatur oft beschriebenen Trypsinisierung wird die Epidermis mit einer aus Trypsin und PBS bestehenden Lösung behandelt, wodurch die Langerhanszellen aus der Epidermis gelöst werden und in das Kulturmedium übergehen (Kawamura, T. et al; 1995; Cohen, P. et al; 1992). Cohen reicherte die Langerhanszellen aus der Fraktion der nicht am Boden adherierenden Zellen durch Dichtegradientzentrifugation an. Dabei hatten typischerweise 5-20 % der Zellen ein dendritisches Aussehen und waren HLA-DR-positiv.

Bei der Isolierung durch Migration nutzt man aus, daß murine (Larsen, C. et al; 1990) und humane Langerhanszellen (Richters, C. et al; 1994; Pope, M. et al; 1995) spontan aus der Epidermis in das umgebende Kulturmedium migrieren. Sammelt und kultiviert man aus muriner Haut spontan migrierte Langerhanszellen, so reifen sie in der Kultur zu eben solchen Langerhanszellen, wie sie nach einer Trypsinisierung kultiviert wurden (Ortner, U. et al; 1996). In der Hautkultur nach Migration konnten während der ersten drei Tage der Kultur bei den epidermalen Langerhanszellen CD 1a-Moleküle und Birbeck-Granula nachgewiesen werden (Rambukkana, A. et al; 1995). Die Intensität der MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DP und -DQ) stieg stark an, und die Zellen wurden etwa am dritten Tag ausgeprägter dendritisch geformt. Auch in situ reagieren Langerhanszellen mit einer solchen Änderung des Phänotypes auf GM-CSF und TNF-α.

Demnach ist das Verhalten von Langerhanszellen in der Hautkultur nach Migration dasselbe wie bei Langerhanszellen nach Kontaktallergie in situ. Das Migrationsmodell kann somit als in-vitro-Versuchsaufbau benutzt werden, um den Verbleib von Langerhanszellen in vivo nach Kontaktsensibilisierung zu untersuchen (Rambukkana, A. et al; 1995).

Bei der Isolierung durch Trypsinisierung ist der zu erwartende prozentuale Anteil an CD 1a-positiven Zellen geringer als durch Migration. Außerdem kann eine funktionelle Beeinflussung der Langerhanszellen durch die Behandlung mit Trypsin nicht ausgeschlossen werden. Deshalb entschieden wir uns, für die Untersuchung des Viabilitätsverhaltens von Langerhanszellen eine Kultur aus migrierten Zellen zu verwenden. Für unsere Versuche lösten wir die Epidermis von der Dermis mittels Dispase und legten die Epidermis in Kulturmedium, in welches die Langerhanszellen spontan migrierten. Da aus der Epidermis auch andere epidermale Zellen, wie z.B. Keratinozyten, in das Kulturmedium dividieren, wurden die Langerhanszellen zudem mit Hilfe von Dynabeads angereichert. Dabei wurden Langerhanszellen über ihren MHC-Klasse-II-Oberflächenmarker, der spezifisch für epidermale Langerhanszellen ist (Romani, N. et al; 1992a), isoliert. An diese Oberflächenstruktur wurden kleine magnetische Kügelchen, sogenannte Dynabeads (Hanau, D. et al; 1988), gebunden. So konnten die gebundenen Zellen mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung getrennt werden.

Es wurde die Methode mittels Dynabeads gewählt, da durch die Anreicherung mit geringem Aufwand ein hoher Anteil CD 1a-positiver Zellen (≈92%) gewonnen werden

konnte. Nachdem sie aus der ursprünglichen Zellsuspension entfernt worden sind, können die Dynabeads wieder durch Detachabeads (Morris, J. et al; 1992) von den Langerhanszellen getrennt werden. Wir benutzten Detachabeads, da die Studien von Morris (Morris, J. et al; 1992) zeigten, daß gereinigte Langerhanszellen eine stärkere funktionelle Aktivität aufweisen, als an Dynabeads gebundene. Die gereinigten Langerhanszellen sind deshalb besonders gut für die Untersuchung der Funktionsmarker in der Kultur geeignet. Durch die Benutzung von Dynabeads und Detachabeads war der Anteil an funktionsfähigen Langerhanszellen in unseren Zellkulturen hoch. Der Anteil von CD 80 lag um 68,3 % und von CD 86 um 59,1 % an Tag 0 der Kultur. Diese Oberflächenantigene interagieren mit dem CD 28-Rezeptor der T-Zellen und verlängern die Bereitstellung von Aktivierungssignalen (Roitt, I. et al; 1995a). Ihre Expression zeigt, daß es sich bei den isolierten Langerhanszellen um funktionsfähige Zellen handelt.

Langerhanszellen sind die einzigen MHC-Klasse-II-positiven und CD 1a-positiven Zellen in der Epidermis (Romani, N. et al; 1992a). Deshalb konnte durch immuncytochemische Färbung mit anti-CD 1a-Antikörpern der prozentuale Anteil an Langerhanszellen in der Kultur bestimmt werden. In den durchgeführten Versuchen lag der Anteil der CD 1a-positiven Zellen an Tag 0, also nach der Anreicherung, bei 91,5 ± 6,5 %. Er blieb auch im Verlauf der Kultur hoch mit 81,5 ± 9,8 % an Tag 5 und 82,0 ± 9,0 % an Tag 10. Bei den Zählungen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde jeweils die Zahl der noch lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Ernte bestimmt. Im Verhältnis zu der am Tag 0 der Kultur in den einzelnen Ansatz pipettierten Zellzahl

ergab sich die Vitalität als prozentualer Anteil überlebender Zellen. Der Verlauf der Vitalität ist in Diagramm 1 (S. 30) dargestellt. Innerhalb der ersten zwei Tage der Kultur sank die Zahl der viablen Zellen um mehr als die Hälfte. Während der folgenden Tage der Kultur nahm die Zahl der lebenden Zellen weiter ab, dies geschah jedoch langsamer als zu Beginn. Der Anteil lebender Zellen betrug im Mittel 39 % nach Tag 2 und ca. 20 % an Tag 10. Es fand sich zu allen Zeitpunkten in der Kultur neben den lebenden Zellen ein Anteil an abgestorbenen (siehe Trypanblau-Ausschlußmethode S. 16).

Das Sterben von Zellen bzw. die Art ihres Todes beschäftigt Wissenschaftler schon seit Rudolf Virchow (Majno, G. et al; 1995). Heute unterscheidet man zwei Arten des Zelltodes: Nekrose und Apoptose (Kane, A.; 1995).

Bei der Nekrose handelt es sich um einen durch äußere Einflüsse provozierten Zelltod (Riede, U.-N. et al; 1993). Erst wenn eine Zelle nicht mehr in der Lage ist, sich an die zellschädigende Bedingung anzupassen, beginnt sie zu sterben. Es kommt zu einer Schwellung und Membranschädigung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums, später zur Lysosomenschädigung. Die verschiedenenartigen Stoffwechselprozesse laufen immer unvollständiger und unkoordinierter ab. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von Enzymen, Mediatoren und anderen proinflammatorischen und toxischen Inhaltsstoffen.

Programmierter Zelltod durch Apoptose ist die andere Form des Zelltodes. Er ist der essentielle physiologische Prozeß bei der kontrollierten Elimination von Zellen, wie

zum Beispiel bei der embryonalen Entwicklung, der Zelldifferenzierung oder der Gewebeerneuerung (Cohen, J. et al; 1993; Martin, S. et al; 1994; Lee, J. et al; 1997). Der apoptotische Zelltod ist morphologisch durch eine schrittweise Fragmentierung der Zelle charakterisiert, wobei insbesondere Größenveränderungen des Zellkerns ein frühes und sicheres Zeichen dieses Prozesses sind (Kerr, J.; 1972). Die entstehenden Zellfragmente enthalten zunächst intakte Organellen und sind von einer Membran umgeben. Hierdurch kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zur Freisetzung von schädlichen Inhaltsstoffen. Deshalb ist die Apoptose ein selektiver und gewebeschonender, nicht entzündlicher Zelltod (Duvall, E. et al; 1986). Die apoptotischen Zellfragmente werden schließlich durch Makrophagen und andere zur Phagocytose befähigte Zellen aus dem Organismus eliminiert (Savill, J.; 1993). Das elektronenmikroskopische Kennzeichen einer apoptotischen Zelle ist ein charakteristisches Cytosol und die Kondensation des Chromatins, wobei sich auch eine Schrumpfung der gesamten Zelle zeigt (Kolde, G. et al; 1993). Ultrastrukturell ist eine frühzeitig beginnende Chromatinkondensation mit einer Randständigkeit des Chromatins sichtbar.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die wir zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur anfertigten, zeigten apoptotische Zellen. Nach siebentägiger Kulturdauer waren die viablen Langerhanszellen ausgeprägter dendritisch geformt und insgesamt kleiner als frisch isolierte Zellen. Am Nucleolus waren auffallende Eindellungen sichtbar. Die Anzahl der cytoplasmatischen Organellen und der Birbeck-Granula war gesunken, die Zahl der Lysosomen war angestiegen. Nach mehreren Tagen der Kultur zeigte die Langerhanszelle auf Bild D die Zeichen von Apoptose. In dem großen, abgeschnürten

Kern der Zelle hatte sich das Chromatin verdichtet. Die typische Schrumpfung der Zellmembran, eine Kondensation des Cytoplasmas und der Organellen sowie eine Absonderung des zusammengedrängten Chromatins mit folgender Abschnürung zu Apoptosekörpern war sichtbar. Durch Birbeck-Granula, die zwischen den Apoptosekörpern zu erkennen waren, konnten die Zellen als Langerhanszellen identifiziert werden.

Eine charakteristische Eigenschaft des Zelltodes durch Apoptose ist der geregelte Abbau der DNA. Das für die Zerstückelung der DNA verantwortliche Enzym ist eine Ca/Mg-abhängige Endonuclease. Dieses Enzym spaltet die DNA in Oligonucleosomen (bis zu 180 Basenpaare) zu einer typischen DNA-Leiter, die mit Agarosegelelektrophorese gezeigt werden konnte (Wyllie, A.; 1980).

Der Nachweis dieser Bruchstücke konnte in unserer Kultur mittels eines spezifischen ELISAs geführt werden, bei dem Mausantikörper Bindungen mit den Enden dieser Bruchstücke eingingen und dadurch die Lösung verfärbten. Dieser CDDE zeigte qualitativ, daß die Zellen durch Apoptose starben. Die Stärke der Verfärbung wurde photometrisch gemessen und zeigte quantitativ die Menge apoptotischer Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur. Der Anteil der Bruchstücke war am zweiten und dritten Tag der Kultur am Größten. An späteren Tagen wurden weniger apoptotische Zellfragmente nachgewiesen.

Zellen des Immunsystems, wie Lymphozyten, polymorphkernige Granulozyten und die Monozyten/Makrophagen werden apoptotisch, nachdem sie einen Zustand der

Aktivierung durchlaufen haben (Sarthou, P et al; 1995; Kabelitz, D. et al; 1995). Aktivierte T-Zellen gehen apoptotisch unter, ausgelöst durch einen auf sie einwirkenden CD3/T-Zell-Rezeptorkomplex (Alderson, M. et al; 1995). Dieser Prozeß wird „activation-induced cell death“ / aktivierungsinduzierter Zelltod (=AICD) genannt. Ein aktivierungsinduzierter Zelltod wurde auch von anderen Autoren für maturierte T-Zellen gezeigt (Janssen, O. et al; 1991; Wesselborg, S. et al; 1993). Aber nicht alle Zellen des Immunsystems erfahren Zelltod durch dieses System (Daniel, P.T. et al; 1997).

Um ein derartiges Verhalten von Langerhanszellen zu überprüfen, wurden Ultrastruktur und Phänotyp der Langerhanszellen während der Kultur comparativ untersucht. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich die Aktivierung der Langerhanszellen. Nach mehrtägiger Kulturdauer ließen sich eine Zunahme der Mitochondrien und ein Anschwellen des Zellkernes bemerken (Bild C). Nach mehreren Tagen der Kultur war der mitochondriale Anteil und auch der Anteil an endoplasmatischem Retikulum angestiegen, desweiteren blieben die Birbeck-Granula im Cytoplasma zu erkennen. Dies sind Zeichen der Aktivierung der Zelle (Kolde, G. et al; 1987), wie sie auch auf der migrierten Langerhanszelle in Bild A zu sehen waren. Zudem waren ein großer Zellkern und starke dendritische Ausstülpungen der Plasmamembran zu erkennen.

Die Untersuchungen des Phänotyps zeigten bei 68,3 ± 20,1 % der Langerhanszellen zu Beginn der Kultur eine CD 80- Expression. Diese Zahl sank im Verlauf auf 17,5 ± 13,9 % an Tag 5 und 10,2 ± 6,3 % an Tag 10 ab. Auch die Expression von CD 86

war rückläufig von 59,1 ± 19,3 % der Zellen an Kulturtag 0 über 41,3 ± 17,1 % an Tag 5 auf 26,5 ± 18,1 % an Tag 10. Somit nahm die Zahl der funktionell aktiven Zellen in der Kultur kontinuierlich ab. Es ist anzunehmen, daß zuerst die maturierten Zellen, die schon gereift waren und deshalb die Marker CD 80 und CD 86 exprimierten, in Apoptose gingen. Somit verhielten sich die Langerhanszellen wie Lymphozyten, bei denen auch primär die aktivierten Zellen apoptotisch untergehen (Munn, DH et al; 1995; Mangan,DF et al; 1993).

In der Viabilitätskurve war ein starker Abfall der Zellzahl zu Beginn der Kultur zu beobachten. In den ersten zwei Tagen der Kultur starb etwa die Hälfte der Zellen, danach verlief die Elimination der Zellen langsamer. Es könnte sich hierbei um zwei unterschiedliche Populationen von Langerhanszellen mit unterschiedlicher Viabilität handeln. Das würde zu der von Shibaki gefundenen unterschiedlichen HLA-DR-Expression auf Langerhanszellen passen (Shibaki, A.; 1995). Hierbei handelt es sich um zwei verschiedene Untergruppen, die sich in verschiedenen Stadien ihrer Reifung befinden und andere Aufgaben besitzen. Möglicherweise unterscheiden sie sich auch in ihrer Viabilität.

Das CD 95/CD 95-L-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zelltodes und beeinflußt maßgeblich den Viabilitätsverlauf von Zellen. CD 95 (=Fas) gehört zur TNF/Wachstumsfaktor-Familie und übermittelt das Signal zur Apoptose (Itoh, N. et al; 1991; Nagata, S. et al; 1993). Es ist auf vielen Zellen vorhanden, so z.B. auf aktivierten humanen B-und T-Zellen (Nagata, S.; 1994). Sowohl das Versagen des

CD 95-Systems als auch die abnorme Produktion von CD 95 verursacht Erkrankungen (Nagata, S.; 1996). Bei bestimmten Krankheiten wird CD 95 stark exprimiert, wie z. B. von lymphoblastoiden Zellen, die durch humanen T-Zell-Leukämievirus (HTLV-1) (Debatin, K. et al; 1990), den Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Kobayashi, S. et al; 1993) oder den Epstein-Barr-Virus (EBV) (Falk, M. et al ; 1992) verändert sind. Das Fas-System spielt auch eine Rolle bei der physiologischen Entwicklung von Geweben, z.B. bei der Apoptose von Keimzellen (Lee, J. et al; 1997), sowie bei der Apoptose im Immunsystem (Spanaus, K.S. et al; 1998).

Damit CD 95 Apoptose auslösen kann, müssen die Zellen einen Rezeptor für CD 95 besitzen. Deshalb kann durch CD 95 nicht jede Zelle apoptotisch werden (Itoh, N. et al; 1991). Dies ist für CD 95 in vivo (Ogasawara, J. et al; 1993) und in vitro (Itoh, N. et al; 1991) nachgewiesen worden. Apoptose wird durch Bindung von CD 95-L (=Fas-Ligand) an CD 95 ausgelöst (Nagata, S.; 1994). So wie die Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren reguliert wird, so wird der apoptotische Zelluntergang durch CD 95 als Rezeptor und CD 95-L als Todesfaktor gesteuert (Nagata, S.; 1994). Für die Auslösung von Apoptose durch das CD 95/CD 95-L-System ist das Ca^{2+}-Niveau des Cytosols beeinflussend (Oshimi, Y. et al; 1995). Es wird aber auch berichtet, daß offensichtlich mehrere metabolische Wege zu DNA-Fragmentation und apoptotischer Chromatinkondensation führen (Sun, D. et al; 1994).

Bei normalen humanen Phagozyten wird CD 95 auf Neutrophilen, Monozyten und Eosinophilen exprimiert (Liles, C. et al; 1996), während die CD 95-L-Expression auf Neutrophile beschränkt ist. CD 40-Ligand kann den CD 95-vermittelten Zelltod bei antigenpräsentierenden dendritischen Zellen wieder aufhalten (Koppi, T. et al; 1997).

Untersuchungen zur Expression von CD 40 auf Langerhanszellen wurden von Sandra Philipp, einem Mitglied unserer Forschungsgruppe, durchgeführt[1].

Die Expression von CD 95 (=Fas) und CD 95-L (=Fas-Ligand) wurde immuncytochemisch auf den Langerhanszellen in der Kultur untersucht. Die Aktivität von CD 95 am Anfang der Kultur lag bei 41,9 ± 25,7 % der Zellen, sie sank auf 19,0 ± 27,3 % an Tag 5 und betrug 11,7 ± 11,6 % an Tag 10. Auch CD 95-L-Aktivität war auf den Langerhanszellen in unseren Versuchsreihen nachweisbar. Auf einigen Zellreihen konnte zu Beginn bis zu 70% CD 95-L-Expression beobachtet werden. Insgesamt war die CD 95-L-Expression durchweg an Tag 0 stärker und sank im Verlauf der Kultur ab. Dies zeigt die Bedeutung des CD 95/CD 95-L-Systems für die Apoptose von Langerhanszellen, ebenso wie auch FACS-Untersuchungen und CD 95-mRNA-Nachweis mittels PCR (Stebut, E. von; 1997) dies belegen.

Der programmierte Zelltod durch Apoptose wird durch verschiedene weitere Gene reguliert. Bcl-2 ist als ein vor Apoptose schützendes Gen bekannt (Kolde, G. et al; 1993; Reed, J.; 1994; Barinaga, M.; 1993.). Es wurde zunächst in humanen B-Zell-Lymphomen beschrieben. An diesen Zellen kann durch den Entzug von IL-3 Zelltod ausgelöst werden, den bcl-2 wieder aufhalten kann (Vaux, David L. et al; 1988). Bcl-2 interagiert mit verschiedenen Proteinen, wie bax (Oltvai, N. Zoltán et al; 1993) und bcl-xl, welche durch homologe Aminosäuren im Aufbau dem bcl-2 ähneln. Bcl-2 und bcl-xl sind Oberflächenmoleküle, die die Zelle vor Apoptose schützen (Vaux, D. et al;

---

[1] Philipp, S., „Untersuchungen von ...“, Berlin, 1999 (unveröffentlichte Arbeit)

1988; Boise, L. et al; 1993). Hämatopoetische Präkursorzellen exprimieren bevorzugt bcl-x und nicht bcl-2. (Park, J. et al; 1995). Bei dem bcl-x handelt es sich um ein dem bcl-2 verwandtes Oberflächenantigen (Boise, L. et al; 1993). Bcl-x kann in zwei verschiedene mRNAs gespalten werden. Das Protein, das von der größeren der beiden mRNAs produziert wird, ist das bcl-xl, welches in unseren immuncytologischen Untersuchungen angefärbt wurde. Bcl-xl verhindert den durch Entzug von Wachstumsfaktor entstehenden Zelltod, ebenso wie bcl-2. Bei Abwesenheit von bcl-x erfahren unreife Zellen des hämatopoetischen Systems von Mäusen einen massiven apoptotischen Zelluntergang (Motoyama, N. et al; 1995). Bax hingegen fördert Apoptose (Oltvai, Z. et al; 1993).

Bei den immuncytochemischen Färbungen, die zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kultur angefertigt wurden. zeigte sich eine Abnahme der Zahl von Langerhanszellen mit bcl-2-Expression von zu Beginn 49,6 ± 31,8 % an Tag 0 auf 10,3 ± 7,8 % an Tag 10. Der Anteil der Zellen mit Expression des bcl-xl ging von 77,6 ± 18,6 % an Tag 0 schon an Tag 5 auf nur 39,3 ± 21,4 % zurück und blieb dann auch zu Tag 10 mit 35,7 ± 16,3 % auf diesem Level. Die bax-Expression war zu Beginn mit 78,6 ± 12,6 % der Zellen hoch und sank auch im Verlauf nur leicht auf 43,0 ± 21,9 % an Tag 5 und 59,8 ± 7,8 % an Tag 10. Es zeigte sich also zu Beginn auf recht vielen Zellen eine Expression der vor Apoptose schützenden Oberflächenmarker bcl-2 und bcl-xl, die im Verlauf der Kultur abnahm. Auch die qualitative Stärke der Expression nahm ab. Die Expression von bax war jedoch auch gegen Ende des Kultivierungszeitraumes recht stark.

Insgesamt konnte in den Versuchsreihen mittels Immuncytochemie und Elektronenmikroskopie gezeigt werden, daß die Zellen in der Kultur eine Veränderung ihres Phänotyps sowie funktionelle Änderungen im Sinne einer Ausreifung zu antigenpräsentierenden, T-Zell-stimulierenden Zellen erfahren. Das in-vitro-Verhalten entspricht dem von Langerhanszellen in vivo nach Kontaktsensibilisierung. Weiterhin nahm die Zahl der vitalen Zellen in der Kultur kontinuierlich ab. Daraus kann geschlossen werden, daß auch die Zahl der Zellen in vivo nach Antigenpräsentation abnimmt, da es weder zu einer Anreicherung von „verbrauchten“ Langerhanszellen im Lymphknoten noch zu andauernder Stimulation von T-Lymphozyten kommt. Es wurde mit Hilfe von CDDE und der Elektronenmikroskopie nachgewiesen, daß die Zellen in unseren Kulturen durch Apoptose starben. Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, daß sich die Zellen nicht auch in vivo apoptotisch eliminieren. Die Funktionsmarker CD 80 und CD 86 wurden zu Beginn auf mehr Zellen nachgewiesen als zu späteren Zeitpunkten der Kultur. Dieser Verlauf weist darauf hin, daß vorwiegend die maturierten Zellen von der Apoptose betroffen waren. Es wurde gezeigt, daß die Apoptose hierbei über das CD 95/CD 95-L-System gesteuert wurde. Dabei kann das CD 95-L sowohl von den Zellen selbst exprimiert werden, als auch von anderen Zellen aus der Kultur. In vivo kann das CD 95-L auch von anderen Zellen stammen, wie z.B. T-Lymphozyten, von denen bekannt ist, daß sie CD 95-L exprimieren (Nagata, S.; 1994). So können die T-Zellen den auslösenden Faktor zur Elimination der Langerhanszellen nach Antigenpräsentation liefern. Damit ist die Antigenpräsentation der Langerhanszellen durch die Auslösung von Apoptose beendet. Ein Versagen dieses Mechanismus könnte zwei mögliche pathologische Konsequenzen haben: zum einen könnte es durch die

fehlende Elimination von Langerhanszellen zu einem Übergewicht dieser, wie z.B. bei der Histiocytosis X kommen. Zum anderen könnte eine andauernde Stimulation von T-Zellen zu deren Entartung in Form eines T-Zell-Lymphoms führen.

Die obigen Versuche bestätigen die apoptotische Elimination von Langerhanszellen aus der Kultur. Da sich die Zellen nach Migration in vitro wie Zellen nach Antigenpräsentation in vivo verhalten, schließen wir, daß funktionell ausgereifte Langerhanszellen auch in vivo durch Apoptose eliminiert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Aiba, Setsuya; Katz, Stephen I.
   Phenotypic And Functional Characteristics Of In Vivo-Activated Langerhans Cells
   Journal of Immunology, Vol. 145, S. 2791-2796 (1990)

2. Alderson, Mark R. et al
   Fas Ligand Mediates Activation-Induced Cell Death In Human T Lymphocytes
   Journal of Experimental Medicine, Vol. 181, S. 71-77 (1995)

3. Azuma, M.; Cayabyab, M.et al
   CD 28 Interaction B7 Costimulates Primary Allogeneic Proliferative Responses By Small, Resting T Lymphocytes
   Journal of Experimental Medicine, Vol. 175, S. 353-360 (1992)

4. Barinaga, Marcia
   Death Gives Birth To The Nervous System. But How?
   Science, Vol. 259, S. 762-763 (1993)

5. Birbeck, A.S.C.; Breathnach, A.S. et al
   An Electron Microscopic Study Of Basal Melanocytes And High Level Clear Cells (Langerhans Cells) In Vitiligo
   Journal of Investigative Dermatology, Vol. 37, S. 51-63 (1961)

6. Boise, Lawrence H.; González-Garcia, Maribel et al
   Bcl-x, A Bcl-2-Related Gene That Functions As A Dominant Regulator Of Apoptotic Cell Death
   Cell, Vol. 74, S. 597-608 (1993)

7. Chang, Chung-Hsing et al
B7-1 Expression Of Langerhans Cells Is Up-regulated By Proinflammatory Cytokines, And Is Down-regulated By Interferon-γ Or By Interleukin-10
Eur. J. Immunology Vol. 25, S. 394-398 (1995)

8. Chatelain, René et al
IL-10 Inhibits ICAM-1 Expression On Human Langerhans Cells But Not On Keratinocytes, Dermal Endothelial Cells Or Fibroblasts
Arch. Dermatol. Res. Vol. 290, S. 477-482 (1998)

9. Cohen, J. John
Apoptosis
Immunology Today, Vol. 14 (3), S. 126-130 (1993)

10. Cohen, Philip J.; Katz, Stephen I.
Cultured Human Langerhans Cells Process And Present Intact Protein Antigens
The Journal Of Investigative Dermatology, Vol. 99, S. 331-336 (1992)

11. Cordell, Jacqueline L. et al
Immunoenzymatic Labeling Of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes Of Alkaline Phosphatase And Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes)
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 32, S. 219-229 (1984)

12. Daniel, P.T. et al
Activation And Activation-Induced Death Of Human Tonsillar B Cells And Burkitt Lymphoma Cells: Lack Of CD 95 (Fas/APO-1) Ligand Expression and Function
European Journal of Immunology, Vol. 27 , S. 1029-1034 (1997)

13. Debatin, K.M., Goldmann, C.K. et al
Monoclonal-Antibody-Mediated Apoptosis In Adult T Cell Leukkemia
Lancet, Vol. 335, S. 497-500 (1990)

14. Duvall, E; Wyllie A.H.
Death And The Cell
Immunology Today, Vol. 7, S. 115 (1986)

15. Falk, M.H.; Trauth, B.C. et al
Expression Of The APO-1 Antigen In Burkitt Lymphoma Cell Lines Correlates With A Shift Towards A Lymphoblastoid Phenotype
Blood, Vol. 79, S. 3300-3306 (1992)

16. Forsey, R.F. et al
Epidermal Langerhans Cell Apoptosis Is Induced In Vivo by Nonanioic Acid But Not By Sodium Lauryl Sulphate
British Journal of Dermatology, Vol. 139, S. 453-461 (1998)

17. Girolomoni, Giampiero
Expression Of B7 Costimulatory Molecule In Cultured Human Epidermal Langerhans Cells Is Regulated At The mRNA Level
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 103, S. 54-59 (1994)

18. Hanau, D.; Schmitt, D.A. et al
A Method for The Rapid Isolation Of Human Epidermal Langerhans Cells Using Immunomagnetic Microspheres
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 91, S. 274 (1988)

19. Inaba, K. et al
The Tissue Distribution Of The B7-2 Costimulator In Mice: Abundant Expression On Dendritic Cells In Situ And During Maturation In Vitro
Journal of Experimental Medicine, Vol. 180, S. 1849-1860 (1994)

20. Inaba, Kayo; Schuler, Gerold et al
Immunologic Properties Of Purified Epidermal Langerhans Cells
Journal of Experimental Medicine, Vol. 164, S. 605-613 (1986)

21. Itoh, , N.; Yonehara, S. et al
The Polypeptide Encoded By The cDNA For Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis
Cell (Cambridge, Mass.), Vol. 66, S. 233-243 (1991)

22. Janssen, O.; Schondelmaier, S. et al
T Cell Receptor/ CD 3-Signaling Induces Death By Apoptosis In Human T-Cell Receptor $\gamma\delta^+$ T Cells
Journal of Immunology, Vol. 146, S. 35-39 (1991)

23. Kabelitz, D. et al
T Cell Apoptosis Triggered Via The CD3/T Cell Receptor Complex And Alternative Activation Pathways
in: „Apoptosis in Immunology“, Hrsg.:Kroemer, Guido.; Martinez-A., Carlos; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 1-14 (1995)

24. Kane, Agnes B.
Redefining Cell Death
American Journal of Pathology, Vol. 146, S. 1-2 (1995)

25. Kawamura, Tatsuyoshi; Furue, Masutaka
Comparative Analysis Of B7-1 And B7-2 Expression In LCs: Differential Regulation By T Helper Type 1 And T Helper Type 2 Cytokines
Eur. J. Immunol , Vol. 25, S. 1913-1917 (1995)

26. Kerr, J.F.R., et al
Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-ranging Implications In Tissue Kinetics
British Journal of Cancer, Vol. 26, S. 239 (1972)

27. Kobayashi, S.; Hirano, T. et al
Transcriptional Repression And Differential Splicing Of Fas mRNA By Early Transposon (Etn) Insertion In Autoimmune LPR Mice
Biochemistrry Biophysiology Research Community, Vol. 191, S. 617-624 (1993)

28. Kolde, Gerhard et al
Programmed Cell Death In Cutaneous Immunopathology
Skin Immune System , Second Edition, S. 327-337 (1993)

29. Kolde, Gerhard; Knop, Jürgen
Different Cellular Reaction Patterns Of Epidermal Langerhans Cells After Application Of Contact Sensitizing, Toxic And Tolerogenic Compounds. A Comparative Ultrastructural And Morphometric Time-Course Analysis
The Journal of Investigative Dermatology, Vol. 89, S. 19-23 (1987)

30. Koppi, T.A. et al
CD 40 Ligand Inhibits Fas/CD 95-Mediated Apoptosis Of Human Blood-Derived Dendritic Cells
European Journal of Immunology, Vol. 27 (12), S. 3161-3165 (1997)

31. Kripke, Margaret et al
Evidence That Cutaneous Antigen-Presenting Cells Migrate To Regional Lymph Nodes During Contact Sensitization
Journal of Immunology, Vol. 145, S. 2833-2338 (1990)

32. Larsen, Christian P. et al
Migration And Maturation Of Langerhans Cells In Skin Transplants And Explants
J. Exp. Med., Vol. 172, S. 1483-1493 (1990)

33. Larsen, Christian P. et al
Functional Expression Of The Costimulatory Molecule, B7/BB1, On Murine Dendritic Cell Populations
J. Exp. Med. Vol. 176 , S. 1215-1220 (1992)

34. Lee, J. et al
The Fas System Is A Key Regulator Of Germ Cell Apoptosis In The Testis
Endocrinology, Vol. 138(5), S. 2081-2088 (1997)

35. Lenz, Angela et al
Human And Murine Dermis Contain Dendritic Cells
Journal of Clinical Investigation, Vol.92, S. 2587-2596 (1993)

36. Lieberman, Philip H. et al
Langerhans Cell (Eosinophilic) Granulomatosis; A Clinicopathologic Study Encompassing 50 Years
The American Journal of Surgical Pathology, Vol. 20 (5), S. 519-552 (1996)

37. Liles, W. Conrad et al
Differential Expression Of Fas (CD95) And Fas Ligand On Normal Human Phagocytes: Implications For The Regulations Of Apoptosis In Neutrophils
J. Exp. Med. Vol.184, S. 429-440 (1996)

38. Macatonia, Steven E. et al
Localization Of Antigen On Lymph Node Dendritic Cells After Exposure To The Contact Sensitizer Fluorescein Isothiocyanate
Journal of Experimental Medicine, Vol. 166, S. 1654-1667 (1987)

39. Majno, Guido; Joris, Isabelle
Apoptosis, Oncosis, And Necrosis
American Journal of Pathology, Vol. 146 (1), S. 3-15 (1995)

40. Mangan, D.; Mergenhagen, S. et al
Apoptosis In Human Monocytes: Possible Role In Chronic Inflammatory Diseases
Journal of Periodontology, Vol. 64, S. 461 (1993)

41. Martin, Seamus J. et al
Dicing With Death: Dissecting The Components Of The Apoptosis Machinery
TIBS , Vol. 19, S. 26-30 (1994)

42. Morris, Jenny et al
Purification Of Functional Active Epidermal Langerhans Cells: A Simple And Efficient New Technique
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 99, S. 237-240 (1992)

43. Morris, Jenny; Chu, Anthony
Purification Of Functional Active Epidermal Langerhans Cells Using Immunomagnetic Beads
Cell Biology: A Laboratory Handbook ; Academic Press, S. 185-190 (1994)

44. Motoyama, Noburo; Wang, Fanping et al
Massive Cell Death Of Immature Hematopoietic Cells And Neurons In Bcl-x-Deficient Mice
Science, Vol. 267, S. 1506-1510 (1995)

45. Munn, D.; Beall, A. et al
Activation-Induced Apoptosis In Human Macrophages: Developmental Regulation Of A Novel Cell Death Pathway By Macrophage Colony-Stimulating Factor And Interferon-γ
Journal of Experimental Medicine Vol. 181, S. 127-136 (1995)

46. Nagata, Shigekazu
Apoptosis-Mediating Fas Antigen And Its Natural Mutation
In „Apoptosis“, (L.D.Tomei and F.C. Cope, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, S. 313ff (1993)

47. Nagata, Shigekazu
Fas And Fas Ligand. A Death Factor And Its Receptor
Advances in Immunology, Vol. 57, S. 129-144 (1994)

48. Nagata, Shigekazu
Fas-Induced Apoptosis, And Diseases Caused By Its Abnormality
Genes Cells, Vol. 1(10), S. 873-879 (1996)

49. Ogasawara, J; Watanabe-Fukunaga, R. et al
Lethal Effect Of The Anti-Fas Antibody In Mice
Nature (London), Vol. 356, S. 806-809 (1993)

50. Oltvai, N. Zoltán; Milliman, Curt et al
Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo With A Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death
Cell, Vol. 74, S. 609-619 (1993)

51. Ortner, Ulrike et al
An Improved Isolation Method For Murine Migratory Cutaneous Dendritic Cells
Journal of Immunological Methods Vol. 193, S. 71-79 (1996)

52. Oshimi, Yoko; Miyazaki, Shunichi
Fas Antigen-Mediated DNA Fragmentation And Apoptotic Morphologic Changes Are Regulated By Elavated Cytosolic Ca^{2+} Level
Journal of Immunology, Vol. 154, S. 599-609 (1995)

53. Ozawa, Hiroaki et al
Interferon-γ And Interleukin-10 Inhibit Antigen Presentation By Langerhans Cells For T Helper Type 1 Cells By Suppressing Their CD 80 (B7-1)-Expression
European Journal of Immunology, Vol. 26, S. 648-652 (1996)

54. Park, Julie; Bernstein, Irwin et al
Primitive Human Hematopoietic Precursors Express Bcl-xl But Not Bcl-2
Blood, Vol. 86, S. 868 (1995)

55. Pope, Melissa et al
Both Dendritic Cells And Memory T Lymphocytes Emigrate From Organ Cultures Of Human Skin And Form Distinctive Dendritic-T-Cell Conjugates
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 104, S. 11-17 (1995)

56. Rambukkana, Anura et al
In Situ Behavior Of Human Langerhans Cells In Skin Organ Culture
Journal Of Laboratory Investigations, Vol. 73, S. 521-531 (1995)

57. Reed, J.C.
Bcl-2 And The Regulation Of Programmed Cell Death
Journal of Cell Biology, Vol. 124, S. 1-6 (1994)

58. Richters, C.D.; Hoekstra, M.J. et al
Isolation And Characterization Of Migratory Human Skin Dendritic Cells
Clinical Experimental Immunology, Vol. 98, S. 330-336 (1994)

59. Riede, Ursus-Nikolaus; Schäfer, Hans-Eckhart et al,
„Letale Zellschädigung“ in: Allgemeine und spezielle Pathologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3.Ausgabe, S. 135-137 (1993)

60. Roitt, Ivan M. et al
in: Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3.Ausgabe, S. 91 (1995a)

61. Roitt, Ivan M. et al
in: Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3.Ausgabe S. 311-312 (1995b)

62. Romani, Nikolaus et al
Cultured Human Langerhans Cells Resemble Lymphoid Dendritic Cells In Phenotype And Function
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 93 (5), S. 600-609 (1989a)

63. Romani, Nikolaus et al
Presentation Of Exogeneous Protein Antigens By Dendritic Cells To T Cell Clones
Journal of Experimental Medicine, Vol. 169, S. 1169-1178 (1989b)

64. Romani, Nikolaus et al
„Identification And Phenotype Of Epidermal Langerhans Cells
in: Schuler G (Ed), Epidermal Langerhans Cells, CRC Press, Boca Raton, S. 49-86 (1992a)

65. Romani, Nikolaus et al
Langerhans Cells As Immature Dendritic Cells
in: Schuler G. (Ed.), Epidermal Langerhans Cells, CRC Press, Boca Raton, S. 191-216 (1992b)

66. Romani, Nikolaus; Schuler, Gerold
The Immunologic Properties Of Epidermal Langerhans Cells As A Part Of The Dendritic Cell System
Springer Seminars in Immunopathology, Vol. 13, S. 265-279 (1992c)

67. Sarthou, P. et al
B Cell Activation And Apoptosis
in: „Apoptosis in Immunology“, Hrsg.:Kroemer, Guido.; Martinez-A., Carlos; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 15-38 (1995)

68. Savill, J.S. et al
Phagocyte Recognition Of Cells Undergoing Apoptosis
Immunology Today, Vol. 14, S. 131 (1993)

69. Schuler, Gerold et al
Structural Organization and Biological Properties of Langerhans Cells
in: Schuler G. (Ed.), Epidermal Langerhans Cells, CRC Press, Boca Raton,
S. 87-129 (1992)

70. Schuler, Gerold; Steinman, Ralph M.
Murine Epidermal Langerhans Cells Mature Into Potent Immunostimulatory Dendritic Cells In Vitro
Journal of Experimental Medicine, Vol. 161, S. 526-546 (1985)

71. Shibaki, Akihiko et al
Differential Responsiveness Of Langerhans Cell Subsets Of Varying Phenotypic States In Normal Human Epidermis
Journal of Investigative Dermatology Vol. 104 (1), S. 42-46 (1995)

72. Silberberg-Sinakin, I.; Thorbecke, G. et al
Antigen-bearing Langerhans Cells In Skin, Dermal Lymphatics And In Lymph Nodes
Cell Immunology Vol. 25, S. 137 (1976)

73. Smith, C. H. et al
Effect Of Granulocyte Macrophage -Colony Stimulating Factor On Langerhans Cells In Normal And Healthy Atopic Subjects
British Journal of Dermatology Vol. 139, S. 239-246 (1998)

74. Spanaus, K.S. et al
TNF-alpha And IFN-gamma Render Microglia Sensitive To Fas Ligand-Induced Apoptosis By Induction Of Fas Expression And Down-Regulation Of Bcl-2 And Bcl-xl
European Journal of Immunology, Vol. 28, S. 4398-4408 (1998)

75. Stebut, Esther von et al
Apoptosis Of Cultured Langerhans Cells Is Mediated By The CD 95 (APO 1/FAS) CD 95-L-System
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 109 (2), S. 406 (1997)

76. Steinman, Ralph; Hoffman, Lloyd
Maturation And Migration Of Cutaneous Dendritic Cells
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 105, S. 2S-7S (1995)

77. Stingl, Georg et al
Immunologic Functions Of 1a-Bearing Epidermal Langerhans Cells
Journal of Immunology, Vol. 121, S. 2005-2013 (1978)

78. Stingl, Georg; Shevach, Ethan M.
Langerhans Cells As Antigen-Presenting Cells
in: Schuler G. (Ed.) Epidermal Langerhans Cells, CRC Press Boca Raton, S. 159-189 (1992)

79. Sun, Dexter Y. et al
Separate Metabolic Pathways Leading To DNA Fragmentation And Apototic Chromatin Condensation
Journal of Experimental Medicine, Vol. 179, S. 559-568 (1994)

80. Teunissen, M.B.M. et al,
Human Epidermal Langerhanszelle Undergo Profound Morphologic And Phenotypical Changes During In Vitro Culture
Journal of Investigative Dermatology, Vol. 94, S. 166-173 (1990)

81. Vaux, D.L.; Cors, S. et al
Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival And Cooperates With C-Myc To Immortalize /Pre-B Cells
Nature, Vol. 335, S. 440 (1988)

82. Wesselborg, S.; Janssen, O.
Induction Of Activation-Driven Death (Apoptosis) In Activated but not Resting Peripheral Blood T Cells
Journal of Immunology, Vol. 150, S. 4338-4345 (1993)

83. Wolff, Klaus
The Fascinating Story That Began In 1868
in: Schuler G. (Ed.) Epidermal Langerhans Cells, CRC Press Boca Raton, S. 1-21 (1992)

84. Wyllie, A.H.
Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis Is Associated With Endogeneous Endonuclease Activation
Nature, Vol. 284, S. 555 (1980)

85. Yokozeki, Hiroo et al
Functional CD 86 (B7-2/B70) On Cultured Human Langerhans Cells
J. Invest. Derm. Vol. 106, S. 147-153 (1996)

6 Anhang: Materialiensammlung

6.1 Geräte

- Gefäße, 1 ml (von Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Reagenzröhrchen 10 ml und 20 ml (von Falcon/Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- Einwegpipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (von Falcon, s.o.)
- Pipettierhilfe Pipetboy acu (von Integra Biosciences)
- Eppendorfpipetten (10 µl, 20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) (von Eppendorf, s.o.)
- Pipettenspitzen (von Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- sterilisierte Scheren, Pinzetten (im Sterilisator für mind. 4h bei 150°)
- Petrischalen für 20 ml Medium (von Falcon, s.o.)
- Gewebeplatten mit sechs Vertiefungen (von Falcon, s.o.)
- Zellfilter aus Nylon 100 µm (steril/ gamma irradiated) (von Falcon, s.o.)
- Aminosilan-beschichtete Objektträger (Objektträger von Menzel-Gläser, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer (von Optik Labor)
- Zell-Zähler Casy 1 Model TT (von Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)
- Zentrifuge Centrifuge 5415 C für Eppendorfgefäße von 1 ml (von Eppendorf, s.o.)

- Zentrifuge Varifuge RF für Röhrchen von 10 ml bzw. 50 ml Volumen (von Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Laborwaage Modell analytic (von Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Lichtmikroskop „Axioskop“ mit einschaltbaren Fluoreszinfiltersystem (von Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Elektronenmikroskop von Zeiss (EM 906, Oberkochen, Deutschland)
- Ultramikrotom Om U3 (von C. Reichert, Austria)
- sterile Werkbank mit Absaugvorrichtung (von Karl Bleymehl, Reinraumtechnik, Inden-Pier, Deutschland)
- Brutschrank (von Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Sterilisator (von Memmert, Schwalbach, Deutschland)

6.2 Medien

- Transportmedium: RPMI 1640 Medium (von Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 2,0 g/l $NaHCO_3$, ohne L-Glutamin mit Zusatz von 25 µl Gentamycin (von Biochrom, s.o.) und 5 ml Penicillin/Streptomycin (von Biochrom, s.o.) zu 500 ml
- Kulturmedium: $RPMI^{++}$: RPMI 1640 Medium (von Seromed/Biochrom, s.o.) mit 2,0 g/l $NaHCO_3$, ohne L-Glutamin; mit Zusatz von 50 ml Fetales-Kälber-Serum (von Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) 2,5 ml Glutamin (von Biochrom, s.o.), 25 µl Choleratoxin (von Sigma, München, Deutschland), 5 ml

Penicillin/Streptomycin (von Biochrom, s.o.), 5 ml Hydrocortison (von Sigma, s.o.), 1,25 mg Amphotericin B (von Sigma, s.o.)

- Dulbecco's PBS (von GibcoBRL/Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) ohne Calcium, Magnesium, Sodium und Bikarbonat mit Zusatz von 5 ml Fetales-Kälber-Serum (von Life Technologies, s.o.) und 5 ml Penicillin/Streptomycin (von Sigma, s.o.) zu 500 ml
- Dulbecco's PBS (von GibcoBRL/ Life Technologies, s.o.) ohne Calcium, Magnesium, Sodium und Bikarbonat, als Waschflüssigkeit
- Dispase I (Neutrale Protease): 5 mg Lyophilisat (von Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland)
- BSA= bovines Serumalbumin (von Sigma, s.o.), die verwandte PBS+BSA-Lösung war 1%
- 2% Paraformaldehyd (von Serva Feinbiochemica GmbH&Co, KG, Heidelberg, Deutschland)
- Aceton (von Merck, Darmstadt, Deutschland)

6.3 Cell Death Detection ELISA (CDDE)-Kit (Boehringer Mannheim)

Inhalt

- Anti-Histon: aus Lyophilisat in 1 ml bidest. Wasser rekonstituiert.
- Anti-DNA-Peroxidase:aus Lyophilisat in 1 ml bidest. Wasser rekonstituiert.
- Beschichtungslösung: das Beschichtungspufferkonzentrat wird 1:100 verdünnt
- Waschlösung: das Waschpuffer-Konzentrat wird 1:10 verdünnt.

- Probenlösung: die Probenlösungen werden so eingestellt, daß jeweils Äquivalente von 2*104 Zellen verwendet werden.
- Konjugatlösung: Anti-DNA-Peroxidaselösung wird in Inkubationspuffer 1:10 verdünnt
- Substratlösung: die ABTS (2,2’ Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)])-Tablette wird im gesamten Volumen des Substratpuffers aufgelöst.
- Mikrotiterplattenmodule, Rahmen, selbstklebende Abdeckfolie

6.4 Immuncytochemie

6.4.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)

- Trisgepufferte Saline (TBS; 0,05 M)

  (aus 4,50 g Tris-Base, 34,25 g Tris-HCl, 43,90 g NaCl (alle Sigma, München, Deutschland) ad 5 l aqua dest)
- Verdünnungsmedium für den Primärantikörper

  (aus 2,5 ml RPMI 1640 (von Biochrom, s.o.) 22,5 ml aqua dest, 2,5 ml Rinderserum (von Biochrom, s.o.){inaktiviert bei 56°C für 30 min.})
- Verdünnungsmedium für Brückenantikörper und APAAP-Komplex

  (5,0 ml Human-AB-Serum (von Biotest AG, Dreieich, Deutschland){inaktiviert bei 56°C für 30 min.}, 25,0 ml RPMI 1640)

- Hexazotierte Astraneufuchsin-Entwicklungslösung

  aus drei Lösungen:

  a) 175,0 ml Trispuffer{aus 0, 98 g Tris-base, 0,30 g Tris-HCl, 1,74 g NaCl (alles von Sigma, s.o.) ad 200 ml aquadest}, 62,5 ml Propandiol-Lösung (Propandiol-Stammlösung 0,2 M: 21,0 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (von Merck, Darmstadt, Deutschland), 100,0 mg Levamisole (Sigma, s.o.)

  b) 125,0 mg Naphtol AS-BI Phosphat (Sigma, s.o.) in 1,5 ml N, N-Dimethylformamid (DMF, von Merck, s.o.)

  c) 50,0 mg Na-Nitrit (von Sigma, s.o.), 1250 µl aqua dest, 500 µl Neufuchsin (von Merck, s.o.)

  Lösung c) wird zu a) gegeben, dann Lösung b) dazu, der ph-Wert mit 2N-HCl auf 8,8 eingestellt und die Lösung filtriert.

- Mayers Hämalaun

  (aus 1,0 g Hämatoxilin (von Merck, s.o.), 0,2 g Natriumjodat (von Merck, s.o.), 50,0 g Kalialaun (von Merck, s.o.){in 1l aqua dest}, 50,0 g Chloralhydrat (von Merck, s.o.),

  1,0 g Citronensäure (von Merck, s.o.); Lösung.muß vor der Verwendung filtriert werden)

- Mausimmunoglobulin (von DAKO, Hamburg, Deutschland)
- APAAP-Komplex: APAAP Maus Monoklonal (von DAKO, s.o.)

  Clone: AP7/6/7

  Isotyp: IgG1 (kappa)

- Kaisers Glyceringelatine (von Merck, s.o.)

6.5 Zellanreicherung

- Dynabeads M-450 Pan Human HLA Class II (von Dynal, Hamburg, Deutschland)
- Detachabeads (for use with Dynabeads M-450) (von Dynal, s.o.)
- Magnet mit Halterung für Reagenzröhrchen MPC 1 (Magnetic Particle Concentrator von Dynal, Oslo, Norwegen)

6.6 Elektronenmikroskopie

- Karnovsky-Lösung (2,5% Glutaraldehyd (von Serva Feinbiochemica, s.o.), 2% Paraformaldehyd(von Serva Feinbiochemica, s.o.), 0,1 M Cacodylatpuffer, ph 7,4 {aus 42,9g Cacodylsäure (von PLANO, W. Plannet GmbH, Marburg, Deutschland) in 1000 ml aqua bidest})
- 1,33% Osmiumtetroxid (0,05M Phosphatpuffer, ph 7,4, von Fluka, Buchs, Schweiz)
- Äthanol (von Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Araldit (von Poersch, Frankfurt, Deutschland)
- Uranyl-Citrat-Bleiacetat (von Leica, Benzheim, Deutschland)
- Propylenoxid (von Serva Feinbiochemica, s.o.)
- Agarose (von BIOzym, Hameln, Deutschland)
- BEEM-Kapseln (von PLANO, s.o.)
- Grids (von PLANO, s.o.)

6.7 Abkürzungen

APAAP= Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase

bax= bcl-2-analogous protein (bcl-2-Analogon)

bcl= b-cell-lymphoma (Protein welches zuerst auf B-Zell-Lymphomzellen entdeckt wurde)

BSA= bovines Serumalbumin

CD= Cluster of Differentiation

CDDE= Cell Death Detection ELISA

CTLA= Oberflächenmolekül

DNA= Desoxyribonukleinsäure

FACS= Fluorescent activated cell sorter

g= Gramm

GM-CSF= Granulocyte-macrophagecolony stimulating factor

HLA= Human leucocyte antigen

ICAM= Intercellular adhesion molecule

Ig= Immunglobulin

IL= Interleukin

L= Ligand

LFA= Lymphocyte function-associated antigens

M-CSF= Macrophage colony-stimulating factor

MHC= Major histocompatibility complex

min.= Minuten

ml= Milliliter

MLR= Mixed- Leukocyte- Reaction

µl= Mikroliter

nm= Nanometer

PBS= spezielles Kulturmedium

PCR= Polymerase chain reaction

RNA= Ribonukleinsäure

RPMI= spezielles Kulturmedium

TBS= Trisgepufferte Saline

TNF-α= Tumornekrosefaktor alpha

U= Units

Lebenslauf

Geboren am 5.Juli 1969 in Berlin

Mutter: Sieglinde Würz, geboren am 24.9.1933 in Berlin, gestorben am 13.6.1999 in Berlin; kaufmännische Angestellte bei der Firma L.C.Köhler

Vater: Joachim Würz, geboren am 6.7.1931 in Breslau, gestorben am 14.8.1997 in Berlin; wissenschaftlicher Angestellter am Hahn-Meitner-Institut

1975-1981	Hanns-Fechner-Grundschule in Berlin-Wilmersdorf
1981-1988	Friedrich-Ebert-Oberschule in Berlin-Wilmersdorf Abschluß: Abitur
1989-1992	Lise-Meitner-Schule in Berlin-Neukölln Abschluß: chemisch-technische Assistentin
1992	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der FU-Berlin
September 1994	Physikum
21.2.95-12.3.95	Famulatur am Krankenhaus Spandau in der Inneren Medizin
13.3.95-2.4.95	Famulatur in der dermatologischen Praxis von Frau Dr. Wacker
August 1995	Bestehen des 1. Staatsexamens
ab September 1995	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
19.2.97-17.3.97	Famulatur in der gynäkologischen Praxis von Hr. Dr. Meckies und Fr. Dr. Lau

15.9.97-15.10.97	Famulatur in der internistischen Praxis von Hr. Dr. Brockhaus
20.3.98	Bestehen des 2. Staatsexamens
27.4.98-14.8.98	Praktisches Jahr am St. Gertrauden-Krankenhaus: Innere Medizin
17.8.98-4.12.98	Praktisches Jahr am St. Gertrauden-Krankenhaus: Chirurgie
7.12.98-26.3.99	Praktisches Jahr an der Charité: Dermatologie
17.5.99	Bestehen des 3. Staatsexamens
7.9.99-4.5.00	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum im Krankenhaus Heckeshorn in der Thoraxchirurgie in der Abteilung von Prof. D. Kaiser, Unterbrechung wegen Beginn des Mutterschutzes
28.12.99	Heirat mit Axel Mario Henschke, geb. 2.8.71, Kaufmann, im Standesamt Berlin-Schöneberg
3.6.00	Geburt der Tochter Luise Henschke

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Cornelia Henschke, an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie andere Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 30.6.2000