

Analyse und Modulation kontaktallergischer Reaktionen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Benno Weigmann
geb. in Frankfurt/Main

Oktober, 1999

"In Erinnerung bleibt man sich immer als Gehender, die Erinnerung macht alles zur Passage - aber wie war das Warten und Versäumen, wie das Nicht-mehr-weiter-Wissen ? Die Erinnerung schweigt davon."

(Botho Strauß: *Die Widmung*)

"Je mehr Erkenntnis, desto länger und besser das Leben. Je mehr Fleiß und Stetigkeit, desto mehr Weisheit. Je mehr Rat und Überlegung, desto mehr Verständnis."

(Abot (Sprüche der Väter): 2, 5-8)

"I took up the study of science in order to find certainty. No, that's not it. Better say, I took up science in order to make the lack of certainty more manageable. Here was a way, I thought, of erecting a solid structure on the very sands that were everywhere, always, shifting under me."

(John Banville: *The Book of Evidence*)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinischen Forschergruppe "Zelluläre und molekulare Mechanismen allergischer Krankheiten" der Universitäts-Hautklinik in Mainz in der Zeit von Januar 1995 bis Oktober 1999 angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. XXX

Erster Gutachter: Prof. Dr. XXX

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. XXX

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.2001

Mit dem Druck dieser Arbeit findet für mich die Auseinandersetzung mit einer in vielerlei Hinsicht interessanten und ergiebigen Thematik ihren vorläufigen Abschluß.

Dank für das Zustandekommen dieser Arbeit gebührt vielen, die mir auf die eine oder andere Weise geholfen haben.

In erster Linie danke ich Prof. XXX für die interessante Themenstellung, für Rat und Vorschläge, in zahlreichen anregenden wissenschaftlichen Gesprächen geäußert, sowie für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in ihrer Arbeitsgruppe.

Mein Dank gebührt außerdem Herrn Prof. XXX, der freundlicherweise die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich sowohl bei Herrn Dr. XXX, Frau Dr. XXX, Dr. XXX und bei Dr. XXX für ihre Unterstützung im alltäglichen Laborbetrieb.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich ebenfalls Herrn Dipl.-Biologe XXX für seine Hinweise aussprechen. Dank auch an alle Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe sowie der AGs Prof. Dr. XXX, Prof. Dr. XXX, Prof. Dr. XXX und Dr. XXX für ihre Unterstützung.

Für die mühsame Arbeit des Korrekturlesens bin ich besonders XXX, XXX und XXX zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
1	Die Haut.....	1
1.1	Die Struktur und Funktion der Epidermis	1
1.2	Die Struktur und Funktion der Dermis	2
1.3	Das Konzept des SIS und SALT	2
1.4	Die Charakterisierung der epidermalen Langerhans-Zellen	4
2	Die allergische Kontaktdermatitis	7
3	Leflunomid	10
4	TNF und TNF-Rezeptoren	13
4.1	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)	13
4.2	TNF-Rezeptoren	14
4.3	TNF-Rezeptor-defiziente Mäuse	14
4.3.1	TNF-Rezeptor 1-defiziente Mäuse	14
4.3.2	TNF-Rezeptor 2-defiziente Mäuse	15
5	Zielsetzung	15
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	17
1	Materialien	17
1.1	Laborgeräte	17
1.2	Plastikwaren.....	18
1.3	Spezielles	19
1.4	Reagenzien, Puffer und Lösungen	19
1.4.1	Reagenzien, Puffer und Lösungen der Zellbiologie.....	19
1.4.2	Reagenzien, Puffer und Lösungen der Molekularbiologie	24
1.5	Cytokine	26
1.6	Seren als Zusätze für Kulturmedien	27
1.7	Kulturmedien	27
1.8	Spezielle Kulturmedien	28
1.9	Antikörper	28
1.10	Mäuse.....	30
1.11	Zelllinien und -Klone	30
2	Methoden	31
2.1	Methoden der Zellkultur	31
2.1.1	Kulturbedingungen	31
2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	31
2.1.3	Bestrahlung der Zellen	31

2.1.4	Einfrieren von Zellen (Kryokonservierung)	31
2.1.5	Auftauen von Zellen	32
2.1.6	Orale Applikation von Leflunomid	32
2.1.7	Präparation von Milzzellen	32
2.1.8	Präparation von Lymphknoten	32
2.1.9	Adoptiver Transfer von Zellen	32
2.1.10	Depletion von CD4+- und CD8+-T-Zellen mittels Dynabeads	33
2.1.11	Isolierung von epidermalen Zellen aus muriner Haut	33
2.1.12	Anreinigung von T-Zellen über Nylonwoll-Säulen	34
2.1.13	Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension mittels Dynabeads	35
2.1.14	Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension mittels MicroBeads (MACS) nach vorheriger Entfernung der toten Zellen	36
2.1.15	FACS-Analyse von Zellen	37
2.1.16	Immunglobulin-ELISA	38
2.1.17	Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung gefällter Immunglobuline	39
2.1.18	Ultrafiltration von antikörperhaltigen Kulturüberständen mit der Amiconzelle ..	40
2.1.19	Präparation von Epidermal Sheets und Immunfärbung von epidermalen Zellen .	40
2.1.20	Fluoreszenzfärbung von Präparaten mit dem Tyramide Signal Amplification Kit (TSA)	41
2.1.21	Primäre allogene MELR (Mixed epidermal lymphocyte reaction) mit naiven T-Zellen	42
2.1.22	Mest (Mouse ear swelling test)	42
2.1.23	Migrationsanalyse von epidermalen Langerhans-Zellen	43
2.2	Methoden der Molekularbiologie	44
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	44
2.2.2	mRNA-Isolierung	44
2.2.3	Reverse Transkription	45
2.2.4	Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)	46
2.2.5	Primer	48
2.2.5.1	Auswahl der Primersequenz	48
2.2.5.2	Rekonstruktion der Primer	49
2.3	Allgemeine Methoden	49
2.3.1	Photographie der Präparate	49
2.3.2	Scannen der Gele	49
2.3.3	Statistische Auswertung	49

III. Ergebnisse 51

Teil1: Bedeutung von TNF bei der Kontaktallergie 51

1	Untersuchungen an TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen	51
1.1	Untersuchungen zur Kontaktallergie bei TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen	51
1.2	Histologische Charakterisierung epidermaler Langerhans-Zellen aus TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen	54
1.3	Stimulationskapazität epidermaler Zellen von TNFR1- und TNFR2- defizienten Mäusen für T-Zellen	57

1.4	Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen	60
2	Expression von TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von epidermalen Zellen	64
2.1	Untersuchungen zur Expression von TNFR1 und TNFR2 auf epidermalen Zellen mittels Epidermal Sheets	64
2.2	Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf Langerhans-Zellen und Keratinozyten	67
2.2.1	Vorversuche zur Testung der anti-TNFR1- und anti-TNFR2-Antikörper	67
2.2.1.1	Expression von TNFR1 und TNFR2 auf Fibroblasten	67
2.2.1.2	Expression der TNFR1 und TNFR2 auf T-Zellen	68
2.2.2	Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212	70
2.2.3	Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf frisch isolierten und kultivierten murinen Langerhans-Zellen sowie Keratinozyten	71
3	Untersuchungen zur Expression der mRNA von TNF-Rezeptoren	76
Teil 2: Wirkung von Leflunomid auf die Kontaktallergie		84
1	Wirkung von oral appliziertem LF auf den Verlauf einer CHS gegen DNFB	84
2	Wirkungszeitraum der Inhibition	86
3	Inhibitorische Wirkung von LF auf eine allergische Reaktion gegen Oxazolon	92
4	Wirkung von LF auf eine inflammatorische bzw. irritative Reaktion	93
5	Antigenspezifität der Wirkung von LF	94
6	Wirkungszeitpunkt von LF bei der Sensibilisierungsreaktion	96
7	Transfer von immunkompetenten Zellen aus LF-behandelten Mäusen	101
8	Histologische Charakterisierung der Langerhans-Zellen von Leflunomid-behandelten Mäusen unter dem Einfluß von DNFB ..	112

9	Migration von Langerhans-Zellen aus LF-behandelten Mäusen ...	115
10	Einfluß von A77 1726 auf den T-Zellklon D10.G4.1	117
11	Topische Applikation von LF	119
IV. Diskussion		120
4.1	Diskussion zu Bedeutung von TNF bei der Kontaktallergie	120
4.2	Diskussion zu Wirkung von Leflunomid auf die Kontaktallergie	127
V. Zusammenfassung		134
VI. Bibliographie		136
VII. Abkürzungsverzeichnis		152
VIII. Anhang		155

I. Einleitung

1 Die Haut

Als eine den ganzen Körper umschließende Hülle kommt der Haut samt ihrer Anhangsorgane eine Reihe verschiedenartiger Aufgaben zu. Die mit Schuppen, Federn oder einem Haarkleid ausgestattete Haut kann vor Verletzungen bewahren und gegen Angriffe von außen schützen. Sie bildet eine geschlossene Abwehrfront gegen den Eintritt von Mikroorganismen. Mit pathogenen Mikroorganismen, denen es gelungen ist, in tiefere Hautschichten vorzudringen, setzt sich das Haut-assoziierte Lymphgewebe SALT (skin associated lymphoid tissue) (1) und das Haut-Immunsystem SIS (skin immune system) (2,3) auseinander.

Darüber hinaus wehrt die Haut schädigende chemische und physikalische Einflüsse ab. Sie kann unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes, bei der Aufnahme von Sauerstoff und bei der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten spielen. Als der Teil des Körpers, der in unmittelbarem Kontakt mit der Außenwelt steht, ist die Haut außerdem ein Sitz wichtiger Sinnesorgane.

Die Haut, Cutis, bildet keine strukturelle Einheit, sondern besteht aus zwei Grundkomponenten: der Epidermis und der Dermis (4), die beide eng zusammenhängen, sich aber sowohl im Aufbau als auch in ihrer Herkunft unterscheiden. Die ektodermale Epidermis liegt an der Oberfläche und besteht aus Epithelgewebe; die tiefergelegene Dermis stammt aus mesodermalem Mesenchym und stellt vornehmlich eine bindegewebsartige Faserstruktur dar. Die Epidermis ist um ein Vielfaches dünner als die Dermis. Von der Epidermis werden eine Reihe verschiedenartiger Strukturen gebildet, während die Dermis verhältnismäßig einfach und gleichförmig aufgebaut ist.

1.1 Die Struktur und Funktion der Epidermis

Bei allen Wirbeltieren ist die Oberhaut, die Epidermis, im Gegensatz zu den Hemichordaten ein mehrschichtiges Epithel. In der Epidermis kann ein dunkles Pigment, Melanin, vorhanden sein. Es wird von den aus der Neuralleiste stammenden und in der Dermis gelegenen Melanozyten gebildet und an die Zellen der Epidermis abgegeben. Die an der Oberfläche befindlichen Zellen der Epidermis enthalten eine gewisse Menge an Keratin. Keratin ist ein wasserunlöslicher Eiweißkörper, der in Nägeln, Haaren und ähnlichen Strukturen vorhanden ist. Die Zellen der äußeren Schicht gehen durch Abnutzung oder Verletzungen allmählich verloren. Sie werden beständig von den unteren Schichten ersetzt, stammen also letztendlich aus der basalen Zellschicht der Epidermis, aus der durch Zellteilung ständig neue Zellen für die aufeinanderfolgenden Zellschichten hervorgehen. Bei allen terrestrischen Amnioten zeigt die Epidermis eine gegenüber den wasserlebenden Formen bedeutsame Veränderung. Um der Gefahr der Austrocknung zu entgehen, ist die Oberfläche der Haut trocken und undurchlässig. Die basalen Zellen werden jedoch weiterhin durch lebende Zellen aufgebaut. Gegen die Oberfläche werden sie jedoch zunehmend abgeplattet, sterben ab und verhornen. Die äußeren Zellen werden abgestoßen. Der Übergang von den tieferen Epidermisschichten in den verhornten Anteil erfolgt bei Säugetieren abrupt. Die basal gelegenen, lebenden Zellen bilden das Stratum germinativum, und die abgeplatteten, toten Zellen der Hornschicht stellen das

Stratum corneum dar. Das Stratum germinativum kann noch einmal in das Stratum basale, eine Schicht, bestehend aus großen, kubischen Zellen, den sogenannten Basalzellen und in das Stratum spinosum, eine vielschichtige Zelllage, in der die einzelnen Zellen durch multiple, stachelartige Interzellularbrücken, den sogenannten Desmosomen, verbunden sind, unterteilt werden. Das Stratum spinosum wird auch als Stachelzellschicht bezeichnet.

Bei Säugern tritt zwischen Stratum corneum und Stratum germinativum an vielen Stellen eine Körnerschicht, das Stratum granulosum, auf. Die Zellen der Körnerschicht enthalten basophile Keratohyalin granula und sind deutlich abgeflacht.

In einigen Hautbezirken, z.B. an Hand- und Fußflächen, kann noch zwischen der Hornhaut und der Körnerschicht eine transparente Schicht, das Stratum lucidum, ausgebildet sein.

1.2 Die Struktur und Funktion der Dermis

Die Lederhaut, als Dermis oder auch als Corium bezeichnet, ist zwar dicker, aber weniger vielgestaltig als die Epidermis. Sie besteht aus einer dichten Bindegewebslage von Kollagenfasern, die einen wesentlichen Schutz vor äußeren Verletzungen bietet. Die tiefere Schicht der Dermis zeigt im allgemeinen eine lockere Textur und ist außerdem ein wichtiger Ort für die Entwicklung von Fettgewebe, das vor allem für eine gute Isolierung bei Warmblütern sorgt.

In die Dermis sind meistens auch Nervenfasern eingesenkt, die die darunter befindlichen Muskelschichten innervieren. Die Dermis ist außerdem mit Blutgefäßen, vor allem mit ausgedehnten Kapillarnetzen und Lymphgefäßen reich versorgt. Diese reiche Vaskularisation ermöglicht bei durchlässiger Epidermis die Abgabe von Stoffen in die Umgebung oder die Aufnahme von Sauerstoff.

Der histologische Aufbau der Dermis umfaßt zwei Schichten:

Das an der Oberfläche befindliche Stratum papillare erstreckt sich bis in die Dermispapillen, die Räume zwischen den epidermalen Reteleisten. Es überwiegen Matrix, Zellen und Kapillaren.

Das breite Stratum reticulare ist vollgepackt mit Kollagenbündeln und elastischen Fasern. Blutgefäße und Zellen sind rar. Im tieferliegenden Stratum reticulare entspringen Haarfollikel sowie Schweißdrüsen, deren Ausführungsgänge die Dermis durchziehen.

1.3 Das Konzept des SIS und SALT

Die dominierende Zellpopulation der Haut stellen die Keratinozyten dar. Daneben kommen Melanozyten, Merkel-Zellen, Langerhans-Zellen, „veiled“ Zellen, dendritische Zellen, Neutrophile, Gewebsmakrophagen, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Fibrozyten, Ductuszellen, Perizyten, myoepitheliale Zellen, glatte Muskelzellen und neurale Rezeptorzellen vor.

Es sollen im folgenden nur die wichtigsten Zellpopulationen genauer betrachtet werden:

Keratinozyten sind vor allem für die Bildung von Keratin, dem Strukturprotein der Haare und Nägel, verantwortlich. Es gibt Hinweise, daß sie an der Immunantwort beteiligt sind, zumal murine Keratinozyten lösliche Faktoren wie IL-1 α (5), IL-1 β (6), IL-3 (7,8), IL-6 (9), IL-7 (10), IL-8 (11), IL-10 (12), TNF- α (11,13), TGF- α/β (14), MIP-2 (13), IP-10 (13) und GM-CSF (8) abgeben.

Thymusepithelzellen weisen eine dem Hautepithel ähnliche Struktur auf. Einige Oberflächenmoleküle der Thymusepithelzellen sind auch auf Keratinozyten der Epidermis zu finden. Die Theorie, daß die Haut - ähnlich wie der Thymus - ein Ort ist, an dem bestimmte T-Zellen ausreifen und daß Keratinozyten der Haut Einfluß auf die postthymische T-Zellreifung haben, wird durch die Tatsache unterstützt, daß eine einzelne Mutation sowohl den Thymus als auch die Haut gleichzeitig betrifft. Ist das Nackt-Gen der Maus mutiert, tritt neben der Haarlosigkeit eine Störung in der Thymusentwicklung auf.

Melanozyten liegen in der Basalschicht der Epidermis und zeigen eine individuell ausgeprägte Dichte. Die hellen, teilweise mit Dendriten versehenen Zellen lassen sich anhand der pigmentierten Melanosomen elektronenmikroskopisch erkennen. Diese Zellen speichern das Hautpigment Melanin, können es aber auch an benachbarte Keratinozyten abgeben.

Merkelzellen kommen einzeln oder gruppiert in der Basalschicht der Epidermis und in der äußeren Wurzelscheide vor. Charakteristisch sind ihre von einer Membran umgebenen Granula, die mit einem elektronendichten Zentrum ausgestattet sind. Epidermale Merkel-Zellen sind beim Menschen mit einem Neuriten synapsenartig assoziiert, was auf eine Perzeptionsfunktion hinweist. Über den Inhalt der neurosekretorischen Granula ist nichts bekannt.

Mastzellen (Bindegewebstyp) spielen bei allergischen Reaktionen und dem Wundheilungsprozess eine Rolle und dienen vor allem der Abwehr von Zecken.

Extravasale Neutrophile sowie auch Histiozyten haben phagozytierende Funktionen, insbesondere bei der Aufnahme von AK-beladenen Mikroorganismen, die in die Haut eingedrungen sind. Sie können aber auch bei entsprechender Stimulation Antigene präsentieren.

Die T-Zellen der Haut, epidermotrophe T-Zellen, bilden eine Gruppe, die speziell dieses Gewebe zu besiedeln scheint. Sie sind in der gesamten Haut verteilt, besonders oberhalb der Venenknoten.

Mit den Thy1+ dendritischen, epidermalen Zellen wurde 1983 in der Epidermis der Maus eine neue Zellpopulation entdeckt (15,16), die der T-Zelllinie zuzuordnen ist, aus dem Knochenmark stammt (17) und durch die Expression des T-Zellrezeptors charakterisiert ist (18). Verschiedene Experimente belegen eine aktive Rolle dieser Zellen bei der Induktion der Toleranz (19-21).

Langerhans-Zellen sind konstitutiv Ia-positive, dendritisch verzweigte Zellen in den suprabasalen Epidermisschichten, vor allem aber im Stratum spinosum und in der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels, die als sehr potente akzessorische Zellen eine zentrale Rolle bei der Einleitung einer Immunantwort in der Haut spielen (22-24).

Meunier und anderen ist es gelungen, auch in der Dermis von Maus und Mensch dendritische Zellen nachzuweisen (25,26).

1.4 Die Charakterisierung der epidermalen Langerhans-Zellen

Langerhans-Zellen machen nur 2-3 % aller epidermalen Zellen aus. Im lichtmikroskopischen Bild sind sie durch eine igelförmige Morphologie oder durch spezifische Anfärbungen, die auf der speziellen Enzymausstattung dieser Zellen beruhen - wie z.B. die ATPase-Färbung (27) - oder aber durch immunzytologische Methoden zu identifizieren. Auf ultrastruktureller Ebene zeichnen sie sich neben den charakteristischen tennisschlägerartig geformten Birbeck-Granula (28), denen eine Beteiligung an der Internalisierung und der Verarbeitung von Antigenen zugemessen wird (29), durch einen großen, gelappten Zellkern, ein klares Zytoplasma und feine Zellfortsätze aus. Langerhans-Zellen bilden mit ihren dendritischen Fortsätzen ein Netzwerk.

Langerhans-Zellen (LC) gehören wie die verschleierte oder „veiled“-Zellen (VC) im Blut und die interdigitierenden dendritischen Zellen (IDC) in T-Zell-abhängigen Arealen von lymphoiden Geweben zu der Gruppe der dendritischen Zellen (DC). Die dendritischen Zellen an sich zeichnen sich durch folgende gemeinsame Merkmale aus:

Sie zeigen eine dendritische oder „veiled“ Morphologie im Mikroskop. Außerdem haben sie im Vergleich zu Makrophagen oder Granulozyten eine geringe phagozytische Aktivität. Das wohl entscheidende Merkmal aller dendritischen Zellen ist die potente Kapazität zur Aktivierung naiver T-Zellen.

Über die Herkunft der Langerhans-Zellen gibt es nur wenige Informationen. Man nimmt an, daß Langerhans-Zellen von einem mobilen Pool von Knochenmark-Vorläuferzellen (30) gebildet werden und sich dann über das Blutssystem auf die verschiedenen Gewebe verteilen, wo sie als Zellen mit dendritischer Morphologie eine Art Netzwerk bilden. Sie verbleiben in ihrem Stammgewebe, bis sie mit einem Antigen in Kontakt kommen, dieses aufnehmen und prozessieren. Dann wandern sie über die drainierenden Lymphbahnen in die Lymphknoten, um als reife Langerhans-Zellen/DC ihre prozessierten Antigenfragmente zusammen mit MHC II-Molekülen den dort ansässigen T-Zellen zu präsentieren. Diese werden stimuliert und expandieren klonal. Die entstandenen T-Zellen gelangen über das Blutssystem an den Ort, wo die Langerhans-Zellen mit dem Antigen in Kontakt gekommen sind und bekommen dort erneut von verbliebenen dendritischen Zellen Antigen präsentiert, wodurch die T-Zellen aktiviert werden. Diese aktivierten T-Zellen setzen Cytokine frei, die als Chemoattraktantien weitere immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Granulozyten anlocken.

Die Langerhans-Zellen bewegen sich als „veiled cells“ von der Haut in die lymphatischen Organe und werden bei ihrer Ankunft zu interdigitierenden Zellen. Die Veränderung der LC von unreifen, ortsgebundenen zu reifen Zellen, die migrieren und effizient naive T-Zellen stimulieren können, geht auch einher mit dem Verlust der Fähigkeit zur Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Langerhans-Zellen zeichnen sich also durch eine Dynamik aus, die sich mit dem Ein- und Auswandern in die Epidermis, mit den Veränderungen ihres Phänotyps und demzufolge auch mit den Veränderungen der Funktion und des Reifungsgrads beschäftigt.

Eine Hypothese besagt, daß residente Langerhans-Zellen in der Epidermis unreif sind und daß sie erst im Gewebe reifen, sobald sie die klassische Charakteristik der DC angenommen haben.

Fraglich ist auch, ob Langerhans-Zellen im Gewebe noch die Fähigkeit zur Teilung besitzen. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein geringer Teil der epidermalen Langerhans-Zellen die S-Phase des Zellzyklus durchläuft. (31).

Über die Funktion der 1868 von Paul Langerhans bei Färbungen von Hautschnitten nach der Gold-Chlorid-Technik entdeckten Zellen (32) herrschte lange Unklarheit. Langerhans selbst wies ihnen eine bestimmte Rolle innerhalb des Nervensystems zu. Nach einer anderen Theorie wiederum wurden Langerhans-Zellen als gealterte Melanozyten betrachtet (28). Erst 100 Jahre später konnte nach Entwicklung der Elektronenmikroskopie die Beobachtung von Inga Silberberg (33) in den 70er Jahren bestätigt werden, daß Langerhans-Zellen als antigenpräsentierende Zellen zusammen mit T-Lymphozyten eine gewisse Rolle bei kontaktallergischen Reaktionen spielen.

Ein entscheidender Durchbruch bei der Aufklärung der Bedeutung von Langerhans-Zellen gelang 1977 durch Arbeiten von G. Stingl und G. Rowden, wobei mit Fc- und C3-Rezeptoren (34) bzw. MHC II-Expression (35) erstmals Zelloberflächenmoleküle auf humanen Langerhans-Zellen identifiziert wurden. Kurz darauf wurden Ia-Antigene auch auf Langerhans-Zellen des Meerschweinchens (36) und der Maus (37) nachgewiesen und erste biochemische Analysen der Ia-Antigene von Langerhans-Zellen des Menschen vorgenommen (38).

Durch weitere immunphänotypische Untersuchungen konnten auf murinen Langerhans-Zellen MHC-Klasse I-Moleküle (39) und das LCA (leucocyte common antigen, CD45) (40), welches auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, nachgewiesen werden. Humane Langerhans-Zellen sind weiterhin durch die Expression des CD4- (40), CD1a- (41), CD1b- (42-45) und des CD1c-Antigens (46,47), das einen Marker für cortikale Thymozyten darstellt, charakterisiert. Weiterhin wurden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und LFA-3 (CD58) auf humanen Langerhans-Zellen des Menschen identifiziert (47,48). Langerhans-Zellen exprimieren HSA, welches kostimulatorische Fähigkeiten besitzt (49). Desweiteren exprimieren Langerhans-Zellen Fc γ RI/CD64, Fc γ RII/CD32 (50) und Fc γ RIII/CD16. Humane Langerhans-Zellen besitzen auch die Fähigkeit, IgE zu binden. Schon in zwei früheren Studien wurden Fc ϵ RII/CD23 und ϵ BP (ϵ -binding protein) auf ihnen entdeckt. Außerdem gelang es, mit Hilfe der RT-PCR-Technik auf Langerhans-Zellen den High-Affinity-IgE-Rezeptor Fc ϵ RI (51) zu identifizieren.

Neben der reichhaltigen Ausstattung mit Membran-gebundenen kostimulatorischen Faktoren produzieren Langerhans-Zellen auch lösliche Faktoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), TNF- α , Interleukin-6 (IL-6), MIP-1 α (macrophage-inflammatory protein) und MIP-1 β (52,53). Die bisher beschriebenen Zelloberflächenmoleküle charakterisieren den immunologischen Phänotyp von ruhenden, frisch aus der Epidermis isolierten Langerhans-Zellen. Wie zunächst bei der Maus und später auch beim Menschen beobachtet werden konnte, führt eine Kurzzeitkultivierung epidermaler Zellen zu charakteristischen, phänotypischen Veränderungen der Langerhans-Zellen. Schon nach eintägiger Kulturdauer ist ein starker Anstieg der Zelloberflächen-Expression von MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Molekülen zu beobachten (54-56). Während sich Fc-Rezeptoren nach ein- bis dreitägiger Kultivierung nicht mehr identifizieren lassen (47,57,58), konnte auf kultivierten Langerhans-Zellen des Menschen die Expression des Interleukin-2-Rezeptors nachgewiesen werden (59). Es wurde von Schuler und Romani schon früher beobachtet, daß frisch isolierte Langerhans-Zellen *in vitro* in der Lage waren, unter entsprechenden Bedingungen große Partikel aufzunehmen (46). Von Heidrun Moll konnte festgestellt werden, daß Langerhans-Zellen intakte *Leishmania major* von einer Größe von 2-5 μ m internalisieren konnten (60,61).

Mit den beschriebenen phänotypischen Charakteristika ähneln frische Langerhans-Zellen den Makrophagen, während kultivierte Langerhans-Zellen Ähnlichkeit mit dendritischen Zellen aufweisen. Wenn auch eine eindeutige Zuordnung der Langerhans-Zellen zu den bekannten hämatopoetischen Zelllinien bisher nicht möglich war, so konnte doch ihre Herkunft aus dem Knochenmark belegt werden (30,62). In einer Arbeit von E. Kämpgen et al. konnte durch Studien der Cytokinrezeptoren auf dendritischen Zellen die Theorie erhärtet werden, daß dendritische Zellen einen von Lymphozyten und Monozyten unterschiedlichen Reifungsweg durchlaufen (63).

Neben den phänotypischen treten auch funktionelle Veränderungen der Langerhans-Zellen während der Kultivierung auf. Frische Langerhans-Zellen können exogene Proteinantigene aufnehmen, diese intrazellulär degradieren und zusammen mit MHC-Klasse II-Molekülen den entsprechenden spezifischen T-Zellen in äußerst effizienter Weise präsentieren (64-66). Die Fähigkeit zum Prozessieren eines intakten Proteins besitzen kultivierte Langerhans-Zellen dann nicht mehr (67,68). Im Gegensatz dazu sind kultivierte Langerhans-Zellen bei der primären, allogenen, gemischten Lymphozyten-Reaktion die besseren Stimulatorzellen, wobei sie in ihrer akzessorischen Potenz sogar dendritische Zellen aus der Milz übertreffen (46,57,69,70). Als morphologische Veränderung der Drei-Tage-Kultur tritt eine verminderte Anzahl von Birbeck-Granula und der sauren Versikel auf; gleichzeitig verlieren Langerhans-Zellen ihre Adhärenz. Außerdem ändert sich auch die Ausstattung der Oberflächenmoleküle. Verstärkt werden MHC I und -II, LFA-1, LFA-3, ICAM-1, IL-2R-p55, CD40 sowie CD80 (71,72) und CD86 (71,72) exprimiert. Die membrangebundene ATPase, der Makrophagenmarker gp 160 (F4/80), FcγRII, Mac-1, p150/95 und CD1a werden herunterreguliert. Die Neusynthese von MHC II-Molekülen nimmt in der 3d-Kultur stark ab. Außerdem kann die reiche Ausstattung mit Adhäsionsmolekülen dazu führen, daß die Langerhans-Zellen mit T-Zellen antigenunabhängige Aggregate bilden.

Aufgrund dieser Befunde vertreten einige Autoren die Hypothese, daß es während der Kultivierung zu einer funktionellen Ausreifung der Langerhans-Zellen kommt, woraus die Fähigkeit zur Induktion primärer T-Zell-Antworten resultiert (57,69,70).

In weiteren Kultivierungsexperimenten wurde gezeigt, daß sowohl die Lebensfähigkeit der Langerhans-Zellen während der Kultivierung als auch die funktionellen Veränderungen unter dem Einfluß bestimmter Cytokine stehen (73-75). Es sind dies in erster Linie GM-CSF, Interleukin 1 und TNF- α . Die Produktion dieser Faktoren durch Keratinozyten, welche die dominierende epidermale Zellpopulation darstellen, konnte nachgewiesen werden (6,76,77). Ein weiterer Punkt betrifft die Frage, welche Signale die Wanderung der Langerhans-Zellen auslösen. Von einigen Autoren wird IL-1 als ein die Wanderung in die Epidermis induzierender Faktor (78,79) und TNF- α als möglicher Kandidat für eine Auswanderung favorisiert (80-82). Da IL-1 von Keratinozyten produziert wird, könnte der Faktor darüberhinaus auch eine Funktion hinsichtlich der Initiation, Amplifikation und Termination von immunogenen Prozessen haben. Mit Hilfe der empfindlichen RT-PCR-Technik konnte entdeckt werden, daß Langerhans-Zellen mRNA von IL-1 β , MIP-1 α und IL-6 exprimieren (13,53,83).

Abschließend kann man folgendes Resümée ziehen: Die bisherigen Studien belegen, daß das parakrine Netzwerk quasi durch zwei Grundkomponenten geprägt ist: Zum einen durch Cytokine, die von Keratinozyten produziert werden und auf Langerhans-Zellen eine regulierende Funktion ausüben können und zum anderen durch Cytokine, die von Langerhans-Zellen exprimiert werden und die zur Regulation von epidermalen Zellen befähigt sind.

2 Die allergische Kontaktdermatitis

In vivo sind die Langerhans-Zellen durch ihre Fähigkeit zur Auslösung einer Kontaktallergie gekennzeichnet. Diese durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion, die nach der Klassifizierung von Coombs und Gell den verzögerten Überempfindlichkeits- oder Typ IV-Reaktionen zugeordnet wird, äußert sich in einem Hautekzem, welches bei einer bestehenden Sensibilisierung ca. 48 Stunden nach Applikation des Allergens seine maximale Ausprägung erreicht (84).

Kontaktallergene sind in der Regel niedermolekulare Substanzen, die als Haptene durch die Bindung an Proteine in eine immunogene Form überführt werden müssen. Um welche Proteinstrukturen es sich dabei handelt, ist bis heute ungeklärt (85-87). Die Haptene selbst sind normalerweise nicht immunogen, erst die Bindung an körpereigene Proteine, also die Entstehung von Hapten-Carrier-Komplexen, führt dazu, daß sie eine Immunreaktion auslösen können. Kontaktallergene können in Kunststoffen, Metallen, Gummi, Medikamenten, Textilien, Kosmetika und auch in Pflanzen vorkommen. Nickelsulfat und Kaliumdichromat sind typische Kontaktallergene, die in Metall-Legierungen vielfach Verwendung finden. Ein bekanntes Beispiel für Pflanzenprodukte, die eine kontaktallergische Reaktion hervorrufen können, ist Urushiol, das aus dem amerikanischen Efeu stammt. Für die experimentelle Induktion der Kontaktsensibilität verwenden Immunologen gewöhnlich verschiedene Nitro- oder Chlor-substituierte Benzole, die leicht an Proteine binden, z.B. Dinitrofluorbenzol (DNFB). Im Gegensatz zu Allergenen führen Substanzen wie Natriumlaurylsulfat oder Natriumdodecylsulfat nicht zu einer Sensibilisierung, vielmehr verursachen sie eine irritative Dermatitis; man bezeichnet sie als Irritantien (88).

Die Mechanismen, die zur Induktion einer Kontaktallergie führen, wurden schon in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts untersucht. Bereits 1942 konnten Landsteiner und Chase (89) zum erstenmal zeigen, daß die Kontaktsensibilität durch Zellen transferiert werden kann. 1957 machten Frey und Wenk (90) die Beobachtung, daß die Zerstörung der die Haut drainierenden, afferenten Lymphgefäße dazu führte, daß eine Sensibilisierung über das entsprechende Hautareal nicht mehr möglich war. Sie lieferten den Beweis dafür, daß intakte Lymphgefäße zur Entstehung der Kontaktsensibilität unerlässlich sind.

1969 konnten Macher und Chase (91) durch eine Reihe von Experimenten zeigen, daß bei der intravenösen Injektion von Kontaktallergenen in die Ohrhaut von Mäusen eine Sensibilisierung eintritt. Sie entfernten einige Stunden nach der Injektion das behandelte Hautstück und stellten fest, daß nur wenige Tiere eine Kontaktallergie aufwiesen.

Anfang der siebziger Jahre konnten dann Silberberg-Sinakin et al. (92) nachweisen, daß Langerhans-Zellen an der Entstehung kontaktallergischer Reaktionen beteiligt sind. Die Beobachtung, daß Langerhans-Zellen auch in Lymphgefäßen und drainierenden Lymphknoten gefunden wurden, veranlaßte sie zu der Annahme, daß Langerhans-Zellen eine zirkulierende

Zellpopulation darstellen, die an der Induktion der Kontaktsensibilität beteiligt sind. Wenig später konnten sie zeigen, daß Langerhans-Zellen Antigene in der Haut aufnehmen und von dort in die drainierenden Lymphknoten wandern. (93)

Nach einigen Hinweisen auf eine Beteiligung der Langerhans-Zellen an der Kontaktallergie (94,95) konnte G.Toews 1980 durch Sensibilisierungsexperimente mit dem Kontaktallergen DNFB erstmals den Beweis erbringen, daß Langerhans-Zellen für die Induktion dieser Reaktion unbedingt erforderlich sind (93). Die Applikation eines Kontaktallergens auf eine Langerhans-zellfreie Haut, wie sie z.B. durch UVB-Bestrahlung auftreten kann (93), führt zur Induktion einer antigenspezifischen Toleranz, die vermutlich durch T-Suppressor-Zellen vermittelt wird (93,96).

Diese Studien wurden von Streilein und Bergstresser (96) bei syrischen Hamstern fortgeführt. Sie fanden, daß Haut ohne Langerhans-Zellen eine Sensibilisierung verhindert.

1985 konnten Knight et al. (97) zeigen, daß sich durch den Transfer kleiner Mengen dendritischer Zellen Allergen-behandelter Mäuse eine Kontaktsensibilisierung auf naive Empfängermäuse übertragen läßt. Macatonia et al. (98) entdeckten, daß Lymphknotenzellen, die 24 h nach der Behandlung der Haut mit FITC entnommen wurden, eine kontaktallergische Reaktion auf unbehandelte Tiere transferieren können. Sie fanden weiterhin heraus, daß die Zahl der dendritischen Zellen in den Lymphknoten nach epikutaner Behandlung mit einem Kontaktallergen zunahm und daß diese dendritischen Zellen syngene T-Zellen zur Proliferation bringen konnten.

1990 gelang M. Kripke (99) der Nachweis, daß I-A positive und F4/80 positive Zellen die Haut nach dem Kontakt mit dem Allergen verlassen und in die drainierenden Lymphknoten wandern.

Diese und noch weitere Daten führten letztendlich zur Formulierung des heutigen Konzepts zur Entstehung einer Kontaktallergie.

Eine Kontaktallergie durchläuft drei Phasen (100):

1. Sensibilisierungsphase

In einem ersten Schritt „sensitization“, diffundiert das eingedrungene Kontaktallergen durch die Haut und reagiert mit körpereigenen Proteinen. Diese konjugierten Proteine werden dann von Langerhans-Zellen internalisiert, prozessiert und, nach Auswanderung in die parakortikalen T-Zellareale der drainierenden Lymphknoten, zusammen mit MHC-Klasse II-Molekülen naiven CD4-positiven T-Zellen präsentiert (99,101).

Einige Kontaktallergene besitzen chemisch reaktive Gruppen, die mit geeigneten Peptiden, die wiederum an MHC-Moleküle gebunden sind, in Kontakt treten können und eine direkte Interaktion zwischen einem Hapten und dem MHC-Peptid-Komplex ermöglichen. Was diesen Aspekt anbetrifft, so wurde in einer Arbeit von Romagnoli et al. (102) die direkte Interaktion von Nickelsalzen mit dem DRw11-MHC II-Peptid-Komplex nachgewiesen. Durch die Bindung von Nickel an ein z.B. MHC II gebundenes Selbst-Peptid werden neue antigene Determinanten geschaffen, auf die T-Zellen reagieren.

Die Langerhans-Zellen wandern nach Allergenkontakt aus der Epidermis als sogenannte „veiled cells“ über die afferenten Lymphgefäße in die drainierenden Lymphknoten aus und entwickeln sich dort in den paracortikalen T-Zell-Arealen zu interdigitierenden Zellen (24,103).

In diesem Zusammenhang spielt E-Cadherin eine entscheidende Rolle. E-Cadherin ist für die Adhäsion zwischen Langerhans-Zellen und Keratinozyten in der Epidermis verantwortlich. Jakob et al. konnten zeigen, daß IL-1, TNF- α und LPS die Expression von E-Cadherin auf Langerhans-Zellen herunterregulieren. Die resultierende Schwächung der Adhäsion der sie umgebenden Keratinozyten scheint die Migration der Langerhans-Zellen zu ermöglichen (104-106).

Es ist noch nicht eindeutig geklärt, welche T-Helferssubpopulation bei dieser Reaktion dominiert. Gocinski et al. (107) fanden heraus, daß abhängig vom jeweiligen Allergen verschiedene T-Subpopulationen präferentiell aktiviert werden. Xu et al. (108) konnten zeigen, daß IFN- γ produzierende CD8⁺ die Effektorzellen sind, während die IL-4/IL-10 produzierenden CD4⁺-Zellen gegenregulatorische Aufgaben erfüllen. Somit unterscheiden sich kontaktallergische Reaktionen von DTH-Reaktionen gegen Proteinantigene, die hauptsächlich von Th1-Zellen getragen werden (109,110).

2. Aktivierungsphase

Die so aktivierten Allergen-spezifischen CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen sekretieren Cytokine, die die charakteristische Entzündungsreaktion initiieren.

Zum einen handelt es sich um IL-2, das mit Hilfe eines autokrinen Mechanismus' die Proliferation von Antigen-aktivierten T-Zellen induziert - hohe IL-2-Konzentrationen können auch Antigen-unspezifische-bystander-T-Zellen stimulieren – , zum anderen bewirkt IL-2 die Synthese von IFN- γ und TNF- α .

IFN- γ bewirkt wiederum auf Makrophagen oder Endothel-Zellen eine verstärkte Expression von MHC-II-Molekülen, die mit einer gesteigerten Effizienz der Antigenpräsentation einhergeht.

Ferner werden Monozyten durch IFN- γ in die Lage versetzt, Antigene verstärkt aufzunehmen und zu inaktivieren.

TNF α führt bei venularen Endothelzellen zu einer gesteigerten Fähigkeit, Leukozyten zu binden und zu aktivieren.

Die Allergen-spezifischen T-Zellen wandern dann aus den Lymphknoten in das Lymphsystem und zirkulieren durch den Körper. Durch einen erneuten Kontakt mit dem gleichen Allergen beginnt dann die Effektorphase.

3. Effektorphase

Die Effektorphase kann in zwei Entwicklungsstufen unterteilt werden: Zum einen in einen Entzündungsschritt, bei dem vasculare Endothel-Zellen zirkulierende Leukozyten in das behandelte Gewebe locken und zum anderen in einen Auslösungsschritt, bei dem aktivierte Makrophagen das fremde Antigen eliminieren.

Unter dem Einfluß von TNF und IFN- γ entwickeln die Endothel-Zellen ihre inflammatorischen Funktionen.

Es werden u.a. vasodilatatorische Substanzen wie Prostaglandine und NO (nitric oxide) gebildet, und die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche wird erhöht. TNF-induzierte Endothelzellen zeigen E-Selektine oder ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1), was strukturell mit dem peripheren Lymphknoten-Homing-Rezeptor von T-Zellen verwandt ist und die Anlagerung von Neutrophilen auf ihrer Oberfläche ermöglicht. 6 h später wird die Bildung von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) induziert.

TNF bewirkt auch in Endothelzellen die Sekretion von IL-8 und MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), die durch Induktion einer erhöhten Affinität von Mac-1 und LFA-1 eine Leukozyten-Extravasation verursachen. Letztendlich verursacht TNF zusammen mit IFN- γ eine Strukturänderung in der Membran von Endothelzellen, die zur Freisetzung von Fibrinogen und damit zu einer Verhärtung des Gewebes führt.

Durch die oben beschriebenen Prozesse werden Effektorzellen wie Monozyten/Makrophagen/Neutrophile angezogen. Makrophagen und Granulozyten wandern nach ca. 48 h in die Epidermis und Dermis ein.

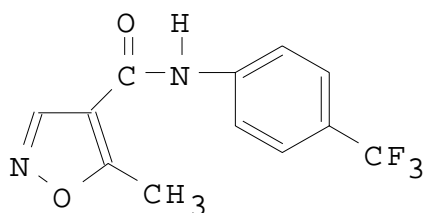
Zur Aktivierung von Makrophagen führen Cytokine wie IFN- γ . T-Zellen, die CD40L exprimieren, sind ebenfalls in der Lage, Makrophagen zu aktivieren (111).

Diese Vorgänge erklären die drei Hauptmerkmale der lokalen Hautreaktion: Die harte Schwellung wird durch die Ödembildung und das zelluläre Infiltrat verursacht, die Rötung entsteht durch die Weitstellung der Gefäße, und die Gewebnekrose wird durch die freigesetzten Enzyme und Faktoren ausgelöst. Die Verzögerung der Manifestation ist auf die Zeit zurückzuführen, die erforderlich ist, um die Allergen-spezifischen T-Zellen zur Cytokinproduktion zu aktivieren bzw. um die Entzündungszellen zu rekrutieren.

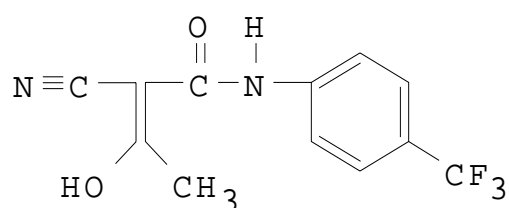
3 Leflunomid

Leflunomid (LF) ist eine immunmodulierende Droge, die eine weitgestreute Reihe von Wirkungen zeigt. Sie hat die Charakteristika von Immunsuppressiva und wirkt anti-inflammatorisch. Der Wirkungsmechanismus ist nicht eindeutig geklärt, kann aber deutlich von dem Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A, FK 506 und anderen immunsuppressiven Drogen abgegrenzt werden.

Leflunomid, von Wissenschaftlern der Firma HMR Hoechst AG synthetisiert, stammt aus einer Serie von Komponenten, die ursprünglich als Herbizide eingesetzt werden sollten. Hierbei handelt es sich um ein Isoxazolderivat mit dem chemischen Namen HWA 486. Es wird von Menschen, Nagern und Hunden gut absorbiert und rasch in die aktive Form mit offenem Ring A77 1726 metabolisiert (112). Diese Komponente ist stabil und repräsentiert 90% der Metabolite im Serum von Menschen und Hunden. Die Halbwertszeit der Komponente beträgt im Mausmodell 30 h und beim Menschen 15-18 Tage.



HWA 486
FW: 270,21



A77 1726

Die ersten Experimente mit Leflunomid wurden 1985 bei Ratten mit adjuvanter Arthritis und mit experimenteller allergischer Encephalomyelitis durchgeführt (113). In diesem Fall inhibierte Leflunomid die adjuvante Arthritis und, in einem bestimmten Zeitraum vor Auslösung der Krankheit gegeben, verhinderte sogar deren Entstehung.

Es folgte dann eine Reihe von Versuchen, die die anti-inflammatorische und immunregulatorische Wirkung von Leflunomid bestätigten. Es konnten einige Wirkungsaspekte aufgeklärt werden, jedoch noch nicht der vollständige Wirkungsmechanismus.

Leflunomid inhibiert die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. die Histaminfreisetzung von Mastzellen und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen inflammatorisch wirksamer Zellen. (114)

Es inhibiert die Zelladhäsion und Migration. Die Adhäsion von weißen Blutzellen an Endothelzellen wird verhindert. Leflunomid bewirkt jedoch keine Inhibition der Expression von Adhäsionsmolekülen (115).

Weiterhin konnten eine Inhibition der Monozytenproliferation und eine beschleunigte Makrophagendifferenzierung beobachtet werden. Somit wird der Eintritt von mononukleären Zellen ins Gewebe und damit auch die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren verhindert.

Leflunomid bewirkt eine Inhibition der Expression von T-Zell-Oberflächenrezeptoren und Cytokinen, jedoch nicht der Sekretion von IL-1 und IL-2. Die Expression des IL-2- und des Transferrin-Rezeptors wird verhindert (116), und damit werden die Aktivierungsstadien von T-Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt blockiert. Außerdem wird vermutlich durch eine Herunterregulation der Rezeptoren die Wirkung von IL-3, GM-CSF und TNF- α inhibiert (112).

Leflunomid ist in der Lage, die Signaltransduktion von Zellen zu unterbinden. A77 1726 inhibiert die Phosphorylierung von Tyrosin. Durch beispielsweise die Inhibition der Jak1 und Jak3 Proteintyrosinkinase wird wiederum die IL-2-Signaltransduktion blockiert, und die IL-2 abhängige Proliferation von T-Zellen findet nicht statt. Außerdem wird die *de novo* Pyrimidin-Biosynthese durch Inhibition der Dihydro-Oronsäure-Dehydrogenase blockiert. Aufgrund der Blockierung der T-Lymphozyten wird auch indirekt die Antikörperbildung von B-Zellen blockiert (117-119).

Desweiteren konnte durch zahlreiche Experimente die Wirkung von Leflunomid bei immunpathologischen Krankheiten geklärt werden. Bei rheumatischen Erkrankungen wie z.B. der adjuvanten Arthritis bei Ratten und Proteoglycan-induzierter (120) Arthritis bei Mäusen

konnte eine inhibitorische Wirkung festgestellt werden. Die Inhibition der Krankheit durch Leflunomid scheint in diesen Fällen durch die Inhibition der Produktion von Auto-Antikörpern bedingt zu sein (121).

Eine weitere autoimmune rheumatische Erkrankung (systemischer Lupus erythematosus) wird durch Leflunomid positiv beeinflusst. Bei MRL/lpr-Mäusen kann eine SLE-ähnliche Erkrankung auftreten, die wie beim Menschen mit Entzündungen, Glomerulonephritis und Knorpel-Abbau einhergeht. Durch die Gabe von Leflunomid konnte die Entstehung der Krankheit verhindert werden, wenn es vor Ausbruch der Symptome gegeben wurde. Leflunomid scheint auch die Tiere von der Krankheit geheilt zu haben, da die Symptome selbst 12 Wochen nach der letzten LF-Gabe nicht mehr auftraten (122).

Bei Autoimmunkrankheiten, z.B. EAE und Myasthenia gravis, die mit der Bildung von Auto-Antikörpern gekoppelt sind, verhindert Leflunomid deren Entstehung (123). EAE kann als Modell für Multiple Sklerose (MS) angesehen werden. Wenn Leflunomid präventiv den Tieren gegeben wurde, trat keine Paralyse auf. Bei der Nervenkrankheit Myasthenia gravis werden Auto-Antikörper gegen die Acetylcholin-Rezeptoren gebildet. Leflunomid verhindert die Entstehung dieser Acetylcholin-Rezeptoren-Antikörper und verhindert die Ausbildung von Symptomen in der experimentellen Myasthenia gravis bei Ratten.

Weiterhin inhibiert Leflunomid durch experimentelle Autoantikörper vermittelte Erkrankungen wie Glomerulonephritis und Tubulonephritis (124,125).

Topische Applikationen von Leflunomid auf die Retina von an EAU (experimentelle autoimmune Uveitis) erkrankten Ratten verhindern eine okuläre Entzündung und die Bildung von lokalen Autoantikörpern (126,127).

Außerdem wurde die Wirkung von Leflunomid bei der Transplantatabstoßung von einigen Forschergruppen untersucht. Die Graft versus Host-Reaktion ist in erster Linie auf die Bildung von Antikörpern zurückzuführen. Leflunomid ist in der Lage, diese zu inhibieren (128,129). Die Host versus Graft-Reaktion ist dagegen primär durch cytotoxische T-Zellen mediiert. Die Fähigkeit von Leflunomid, die Abstoßung von transplantierten Organen zu verhindern, weist auf die humorale und zell-vermittelte Regulationsfähigkeit von Leflunomid hin. Die lange Überlebenszeit der Spenderorgane - selbst bei Einstellung der LF-Behandlung - spricht für eine Induktion einer spezifischen Immuntoleranz bei den Empfängern (130,131).

In letzter Zeit konnte ein weiterer Effekt von Leflunomid im Zusammenhang mit der Typ I-Allergie und der Antikörperproduktion gefunden werden. Leflunomid verhindert im Tiermodell der allergischen Asthma-Erkrankung die Antigen-spezifische Immunglobulinproduktion nach Sensibilisierung mit dem Allergen. Sensibilisiert man Ratten oder Mäuse mit Ovalbumin und gibt Leflunomid oral während der ersten und zweiten Immunantwort, dann ist die Antikörperproduktion von IgE, IgG1, IgG2 und IgM sowie die OVA-spezifische IgE- bzw. OVA-spezifische IgG-Antwort supprimiert (132-134).

Die Wirkung von Leflunomid auf eine Kontaktallergie (Typ IV) wurde von anderen Forschern bis dato noch nicht untersucht. Bisher sind lediglich Untersuchungen aus dem Bereich der DTH-Reaktionen gegen Proteinantigene bekannt.

Leflunomid wurde von Hoechst Marion Roussel in der 2. Hälfte des Jahres 1998 in den USA unter dem Namen Arava für die Behandlung von aktiver rheumatoider Arthritis zugelassen. Arava wurde laut klinischer Studie gut vertragen, und die Nebenwirkungen wie Diarrhöe, Hautausschlag, Haarausfall und erhöhte Leberfunktionen sind reversibel (135).

4 TNF und TNF-Rezeptoren

4.1 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Die Wirkung von TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) konnte schon 1893 von Coley (136) beobachtet werden. Im Zuge einer bakteriellen Infektion stellte er bei Krebspatienten im Endstadium einen kurativen Effekt fest. Diese indirekte Antitumor-Aktivität wird durch die Freisetzung von Endotoxinen verursacht, welche zur Freisetzung von TNF führen. Später wurde im Tiermodell festgestellt, daß der Faktor eine hämorrhagische, also "blutende" Nekrose des Tumorgewebes verursacht (137) und deshalb Tumor-Nekrose-Faktor genannt wird. In unabhängigen Studien wurde 1985 von Beutler TNF- α oder Cachectin gefunden (138). Lymphotoxin oder TNF- β wurde 1988 bei Studien über cytotoxische Aktivitäten von T-Zellen entdeckt (139). Später fand man heraus, daß TNF- α und TNF- β stark verwandte Faktoren sind.

TNF- α und TNF- β haben fast identische Gesamtstrukturen trotz geringer Sequenzidentität (33%) (140). Die aktive Form ist ein Homotrimer (141,142). Beide Moleküle kompetitieren um die Bindung von TNF-Rezeptor 1 bzw. TNF-Rezeptor 2. TNF- α ist ein Typ II-Membranprotein, das durch Metalloproteinasen prozessiert wird (143). TNF- α als ein pleiotropes proinflammatorisches Cytokin wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen sowie B-Zellen, T-Zellen und Fibroblasten sekretiert (144).

TNF ist in der Lage, eine CHS zu modulieren. TNF- α , wenn es in die Ohren von Mäusen injiziert wird, führt zu einer raschen Reduktion der Dichte der epidermalen Langerhans-Zellen (80,145,146). Es konnte gezeigt werden, daß TNF- α die Viabilität von Langerhans-Zellen verlängert, obgleich es bei der funktionellen Reifung keine Rolle spielt (75). Dermale Injektionen von TNF- α ziehen eine Akkumulation von Langerhans-Zellen in den drainierenden Lymphknoten nach sich (80,81). Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß TNF- α als Migrationsstimulus auf Langerhans-Zellen wirkt. TNF- α kann auch eine immunsupprimierende Aufgabe zugeschrieben werden. Streilein et al. (146,147) beobachteten, daß UVB-Bestrahlung eine TNF-Freisetzung von Keratinozyten bewirkt und so einer durch DNFB ausgelösten kontaktallergischen Schwellungsreaktion entgegenwirkt. Außerdem wurde demonstriert, daß intradermale Injektionen von TNF- α Langerhans-Zellen in der Epidermis immobilisieren, was eine Unterdrückung der CHS-Reaktion zur Folge hat (145,146,148). Eine andere Arbeitsgruppe berichtete von morphologischen Schäden bei Langerhans-Zellen, die durch TNF- α verursacht worden seien (149). Ebenso wurde beobachtet, daß eine TNF-Behandlung von dendritischen Zellen eine Hochregulation von CD44 bewirkte (150,151).

Ergebnisse aufgrund kontroverser Studien bezüglich des Blocking-Effektes von anti-TNF- α mAb wurden am murinen Modell ermittelt. Während eine systemische Gabe von TNF-mAb vor der Auslösung der Reaktion eine CHS verhinderte (82), zeigten andere Forschergruppen, daß TNF-mAb nur dann effektiv eine CHS-Reaktion unterdrückte, wenn es während der afferenten oder "Priming"-Phase gegeben wurde (152). Die Rolle von TNF- α in

entzündlichen und immunologischen Reaktionen kann als protektiv oder pathologisch eingeschätzt werden, jeweils abhängig von der Zeitwahl, den Ziel-Zellen und der Stärke der inflammatorischen Reaktion.

Immunhistologische Untersuchungen ergaben, daß Keratinozyten in ihrer TNF- α Expression keineswegs durch allergische Reaktionen, ausgelöst durch Nickel-Sulfat, beeinflusst wurden (153). Andere Studien wiederum belegten, daß TNF- α mRNA durch eine CHS hochreguliert wird (154).

4.2 TNF-Rezeptoren

Für die spezifische TNF- α -Bindung wurden zwei verschiedene Rezeptoren kloniert und sequenziert: eine 55-kDa (p55) Form bzw. TNF-R1 (CD120a) und eine 75-kDa (p75) Form bzw. TNF-R2 (CD120b). Obwohl die beiden Rezeptoren unterschiedlich sind, zeigten sie doch Ähnlichkeiten im Muster der Cystein-reichen Domänen in der extrazellulären Komponente (155-157). Lösliche Formen beider Rezeptoren konnten im Serum von Krebs-Patienten nachgewiesen werden. Die löslichen Rezeptoren stammten von der extrazellulären Domäne der Rezeptoren und sollten inhibitorisch auf eine TNF-induzierte Reaktion wirken.

Die Mehrheit der Zellen und Gewebe exprimieren beide TNF-Rezeptoren mit Ausnahme von Erythrozyten und ruhenden T-Zellen (158,159). Die spezifische Funktion der Rezeptoren wird gegenwärtig noch untersucht. Einige Funktionen wurden bereits aufgeklärt. Agonistische Antikörper gegen den TNF-Rezeptor 1 zeigten einen Zusammenhang mit Cytotoxizität, Fibroblastenproliferation, Resistenz gegenüber Chlamydien und der Synthese von Prostaglandin E₂ (160-162). Antagonistische Antikörper gegen den TNF-Rezeptor 1 spielten bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (162-164) eine Rolle, während der TNF-Rezeptor 2 die Proliferation von Thymozyten und cytotoxischen T-Zelllinien bewirkte (165). Diese Erkenntnisse führten zu folgendem Modell: Beide Rezeptoren haben eine nicht redundante Signaltransduktion. Der TNF-Rezeptor 1 kann verschiedene TNF-Wirkungen wie Cytotoxizität, Induktion von Mangan-Superoxid Dismutase (MnSOD) und NF- κ B bedingen, während der TNFR2 die Proliferation von primären Thymozyten und T-Zellen induzieren kann (162-164). Bei geringen Konzentrationen bindet TNF vornehmlich an den TNFR2, da seine Bindungsaffinität größer als die von TNFR1 ist. Der TNFR2 scheint auch eine indirekte Rolle bei TNFR1-Funktionen zu spielen, da er gebundenes TNF an den niederaffinen TNFR1 abgibt. Eine Kreuzvernetzung der Rezeptoren ist für eine Aktivierung notwendig (166,167). Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob das TNF-Trimer an zwei oder drei TNF-Rezeptor-Moleküle bindet. Vermutlich reichen für eine Aktivierung des TNFR2-Signals bereits zwei vernetzte Moleküle aus, da der TNFR2, im Gegensatz zum TNFR1, einen "spacer" zwischen der transmembranösen Region und den cysteinreichen Domänen aufweist.

4.3 TNF-Rezeptor-defiziente Mäuse

4.3.1 TNF-Rezeptor 1-defiziente Mäuse

Bereits 1993 wurden die ersten TNF-Rezeptor 1-defizienten Mäuse von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen generiert. Eine schweizer Arbeitsgruppe der Hoffmann-La Roche AG fand heraus, daß ihre TNF-Rezeptor 1-defizienten Mäuse resistent gegenüber geringen Dosen, jedoch nicht gegenüber hohen Dosen von LPS waren (168). Demnach scheint der TNFR1

wichtig für die von geringen Dosen LPS verursachte Sepsis zu sein. Eine kanadische Arbeitsgruppe untersuchte bei ihren Mäusen auch den Einfluß von Endotoxin auf die Immunabwehr und stellte fest, daß die Thymozytenentwicklung in den TNFR1-defizienten Tieren nicht verändert war (169).

Später sind die Tiere mehreren Arbeitsgruppen zugänglich gemacht geworden, die sie auf weitere Aspekte hin untersuchten. So wurde eine TNF-induzierte Expression von VCAM-1 und E-Selectin dem TNFR1 zugeschrieben. Damit reguliert der TNFR1 die Expression von Adhäsionsmolekülen und kann somit in die Leukozyteninfiltration eingreifen (170).

TNFR1-defiziente Mäuse sind für Infektionen, ausgelöst durch *Listerien* und *Mycobakterien*, anfällig. Sie können das Wachstum der Bakterien nicht kontrollieren. Anders ist die Situation bei der Infektion mit *Leishmania major*. Makrophagen von TNFR1-defizienten Mäusen sind befähigt, *L. major* zu töten (171). Die dafür erforderliche Makrophagenaktivität und die Produktion der NO-Synthase scheinen also nicht vom TNFR1 abzuhängen.

In einer weiteren Studie wurde die Rolle des TNFR1 in bezug auf die Etablierung follikulär dendritischer Zellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, untersucht (172). Man fand heraus, daß die Expression von TNFR1 auf nicht aus dem Knochenmark stammende Zellen essentiell für die Entwicklung follikulär-dendritischer Zellen und germinaler Zentren ist.

4.3.2 TNF-Rezeptor 2-defiziente Mäuse

1994 konnten TNFR2-defiziente Mäuse untersucht werden (173). Diese Tiere sind weniger sensitiv als die Wildtypen gegenüber dem TNF-induzierten septischen Schock und nicht sensitiver gegenüber hohen Dosen von LPS. Die TNFR2-defizienten Tiere zeigten eine normale T-Zellentwicklung.

Weiterhin scheinen der TNFR2 und der TNFR1 wichtig für die protektive Aktivierung der Neuronen bei Schlaganfällen oder Gehirntraumata zu sein (174).

Auch bei der Pathogenese von experimenteller cerebraler Malaria spielen beide TNF-Rezeptoren eine wichtige Rolle (175).

5 Zielsetzung

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von TNF bei einer kontaktallergischen Reaktion am Modell von TNF-Rezeptor 1- und TNF-Rezeptor 2-defizienten Mäusen untersucht. Die Rolle der TNF-Rezeptoren bei der Kontaktallergie ist weitgehend ungeklärt, zumal es auch unklar ist, ob murine Langerhans-Zellen TNF-Rezeptoren exprimieren. Die Wirkung von TNF auf Langerhans-Zellen wird ebenfalls konträr diskutiert. Ausgehend davon, führte dies zur Entwicklung einer Hypothese, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Es sollte zunächst geklärt werden, ob TNFR1-defiziente und TNFR2-defiziente Mäuse überhaupt eine kontaktallergische Reaktion aufweisen können. Im folgenden wurde die Expression der TNF-Rezeptoren genauer untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der immunsuppressiven Wirkung von Leflunomid bei Überempfindlichkeitsreaktionen des Immunsystems (Typ I-III). Der inhibitorische Einfluß von Leflunomid bei einigen Immunreaktionen ist bereits bekannt. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Effekt von Leflunomid auf eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ (Typ IV). Unter diesem Reaktionstyp versteht man verschiedene Manifestationen, wobei sich diese Studie mit der Kontaktallergie (CHS) als häufigster Erkrankung der Haut befaßt. Es ist zu vermuten, daß Leflunomid aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung auch auf eine

CHS inhibierend wirken kann. In diesem Fall könnte Leflunomid als Medikation bei einer CHS eingesetzt werden. In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen eine inhibierende Wirkung von Leflunomid bei einer CHS beobachtet werden kann.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien

1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Mettler HS4 (Mettler, Gießen) Precisa 120A (Wolfinger GmbH, Straubenhardt)
Außenarm-Meßuhr	Mitutoyo 209-875 (Rheinwerkzeuge, Mainz)
Backofen	T 6030 (Heraeus Instruments, Hanau)
Bestrahlungsgerät	Gammacell 2000 (Mølsgaard Medical, Risø, DK)
Brutschrank	WTC Binder (Binder, Tuttlingen)
CO ₂ begaster Inkubator	Heraeus B 5061 EK-CO ₂ (Heraeus, Hanau)
Dispenser	Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Littau, CH)
Digitalwaage	Basic Typ 1202 (Sartorius, Göttingen)
Elektrophoresekammer	Gel-Elektrophoresekammer (von Keutz, Reiskirchen)
Eppendorfpipetten	Eppendorf Reference, Vario-Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer FACScan mit Cellquest V1.2.0 (Becton-Dickinson, Heidelberg)
Flüssigstickstofftank	BT40 (L'air Liquide, Wiesbaden)
Geiger-Müller-Zähler	LB 1210B (Berthold, Wildbad)
Imaging-System	E.A.S.Y. enhanced analysis system (Herolab, Wiesloch)
Labor-Kühlzentrifuge	Minifuge 2 (Heraeus-Christ, Osterode)
Netzgerät	Power PAC 3000 (BIO-RAD)
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, IKAMAG REO (Janke und Kunkel, Staufen)
Mikroskope	Zeiss (Zeiss, Oberkochen) CK2 (Olympus, Hamburg) CH2 (Olympus, Hamburg)
Mikrowellengerät	Microchef FM 2915 Q (Moulinex)
Pipettierhilfe	Pipetus akku (LABOTEC Vertriebs GmbH, Wiesbaden)
pH-Meter	CG 840 mit Einstabmeßkette N2042 A (Schott, Hofheim)
Photoapparat	SC 35, Typ 12 (Olympus, Hamburg)
sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air HB 2448 (Heraeus, Hanau)
Szintillationszähler	1205 Betaplate (LKB Wallac, Freiburg)
Taumler	Heidolph Polymax 1040 (LABOTEC Vertriebs GmbH, Wiesbaden)
Thermocycler	Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf)
Ultrafiltrationskammer	Cell Modell 12 mit Membran PM 30 (Amicon, Witten)
Ultraschallbad	Transsonic T570 (Elma, Singen)
Vakuumentrockner	Kryofix S (Bachhofer, Reutlingen)
Vortex	Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York)
Wasserbad	Typ 1012 (GFL, Burgwedel) Typ 1083 (GFL, Burgwedel) No 001-7983 (Haake, Karlsruhe)
Zählhilfe	Laboratory Counter (Clay Adams, Becton-Dickinson, Heidelberg)
Zellharvester	1295-001 Cell Harvester (LKB Wallac, Freiburg)
Zentrifugen	Sorvall RT 6000 D (DuPont, Bad Homburg) Biofuge A (Heraeus Sepatech, Hanau)

1.2 Plastikwaren

Die Plastikwaren wurden bis auf wenige Ausnahmen steril bezogen.

unbeschichtete bakteriologische Petrischalen (Greiner, Nürtingen)

6 cm (no 628102)

10 cm (no 663102)

14,5 cm (no 639102)

Die Petrischalen wurden zur Präparation von Zellen, Isolierung von epidermalen Zellen und Kultur von Zellen verwendet.

Zellkulturflaschen (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg oder Greiner, Nürtingen)

25 cm²/50 ml (no 3013 oder 163371)

75 cm²/250 ml (no 3084 oder 80 cm²/200 ml no 147589)

175 cm²/800 ml (no 3028 oder 156502)

Zellkulturplatten (Costar, Technorama, Fernwald)

6-well-Makroplatte (no 3406)

24-well-Makroplatte (no 3424)

Diese Zellkulturplatten wurden zur Kultivierung von T-Zellen eingesetzt.

Mikrotiterplatten

96-well-Flachboden (Greiner, Costar, no 3598)

Die Mikrotiterplatten wurden zur Durchführung von Proliferationstests benötigt.

Zentrifugenröhrchen

50 ml Spitzboden (Greiner, Nürtingen; no 272261)

10 ml Spitzboden (Greiner, Nürtingen; no 155170)

Polypropylen-Reagenzgläser (Falcon, Heidelberg oder TPP, Renner GmbH, Dannstadt)

12 x 75 mm Rundbogen (no 2053 oder 2052)

Die Reagenzgläser wurden zur Durchführung von FACS-Analysen benutzt.

15 ml Zentrifugenröhrchen (no. 9116) für Beads-Inkubation

Einfrierröhrchen (Cryotubes, Nunc, Wiesbaden)

1,8 ml (no 3-63401)

Eppendorfcaps (Sarstedt, Nümbrecht)

1,5 ml (no 72.690)

0,5 ml (no 72.699)

Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten

100-1000 µl (blau) (Greiner, Nürtingen; no 686290)

10-100 µl (gelb, kristall) (Sarstedt, no. 70.760)

1-10 µl (kristall) (Eppendorf, no. 0030001.168)

PCR-Reaktionsgefäße (GeneAmp thinwalled reaction tubes)

(Perkin-Elmer, Norwalk, C.T.; Cat-No. N801-0537)

Für die PCR wurden diese speziellen, dünnwandigen Reaktionsgefäße wegen ihrer besseren Wärmeleitfähigkeit verwendet.

Plastikpipetten (Sarstedt, Nümbrecht)

10 ml (no. 86.1254.001.)

Microspin-Gefäße (Pharmacia, Uppsala)

no.27-9255-01 (Quick Pep Mikro mRNA Purification Kit)

Zellfilter (Cell strainer, Falcon-Becton-Dickinson, Heidelberg)

100 µm Nylon (Cat-No. 2360)

1.3 Spezielles

Einmalspritzen

1 ml (Ersta, Mitlacher, Mainz; no 1402) oder

1 ml Omnifix tuberkulin DIN 13098-A-1LN (B.Braun, Melsungen)

Einmalkanülen

0,7 x 33 mm (no 12), (Eurolab, München)

0,4 x 21 mm (no 20), (Eurolab, München)

0,7 x 30 mm 22G x 1¼ Luer-Lock Sterican® (no. 04657624), (Braun, Melsungen)

0,8 x 40 mm 21G x 1¼ Luer-Lock Sterican® (no. 04657527), (Braun, Melsungen)

Sterilfilter

Einmal-Filterhalter

0,2 µm Porengröße (FP 030/3), (Scheicher & Schuell, Dassel)

0,45 µm Porengröße (FP 030/2), (Scheicher & Schuell, Dassel)

0,22 µm Millex®-GV (Millipore, Molsheim)

0,2 µm MEMBREX (no. 4251012), (MembraPURE GmbH, Bodenheim)

Zur Sterilfiltration wurden 0,2 oder 0,22 µm Filter verwendet.

Sephadex-Säulen PD10 (Pharmacia, Uppsala)

Die PD10-Säulen wurden zur Entsalzung von gefällten Antikörper-Überständen benutzt.

Nylonwolle

Es wurden 0,6 g Nylon-Wolle je Spritze bei der Reinigung von T-Zellen über Nylon-Wolle-Säulen verwendet.

Magneten zur Separation von Dynabeads-gekoppelten Zellen

(Paesel & Lorei, Frankfurt und Dynal MPC®, Dynal, Oslo)

Die Magneten sind in den Fuß der Röhrenständer eingearbeitet und besitzen ein ausreichendes Magnetfeld zur Abtrennung von Zellen. Es wurden verschiedene Modelle entsprechend der Röhrenggröße verwendet.

Parafilm (American-can-company)

Nescofilm

Nylon-Gaze (Schweizerische Seidengazefabrik, Mitlacher)

Nybold HO-190, 190 µm Porengröße

MACS-Trennsäulen für die Positiv-Selektion (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach)

Typ LS⁺ (Cat-No. 424-01)

Typ Large cell separation columns (Cat-No. 422-02)

MACS-Magneten zur Separation von MACS Microbeads-gekoppelten Langerhans-Zellen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach)

VarioMACS (Cat-No.431-02)

1.4 Reagenzien, Puffer und Lösungen

1.4.1 Reagenzien, Puffer und Lösungen der Zellbiologie

Alle verwendeten Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, über 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert.

ABTS 2,2-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure (Sigma, Deisenhofen)

Das Chromogen ABTS wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml beim ELISA verwendet.

Acetat-Puffer

Lösung A: 2,3 ml 96% Essigsäure ad. 200 ml Aqua dest.

Lösung B: 4,6 g NaAcetat ad. 200 ml Aqua dest.

Der Acetat-Puffer setzt sich aus Lösung A und B wie folgt zusammen:

100 ml Lösung A

125 ml Lösung B

275 ml Aqua dest.

500 ml, wobei der pH-Wert mit NaOH auf 4,9 eingestellt wurde.

Der Acetatpuffer wurde bei 4°C gelagert.

AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol, Sigma, Deisenhofen)

Es wurden 0,4 g AEC in 100 ml Dimethylformamid gelöst. AEC-Lösung wurde bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. AEC wurde mit Acetatpuffer als Substrat bei Immunperoxidasefärbungen verwendet.

Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Roth, Karlsruhe)

Es wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zur Proteinfällung aus antikörperhaltigen Zellüberständen eingesetzt.

Ammoniumthiocyanat (Roth, Karlsruhe)

Diese Chemikalie wurde für die Präparation von Zellen aus Epidermal Sheets verwendet.

Amphotericin B (500 x, Boehringer, Mannheim)

Es wurde 0,1% Amphotericin B dem 3d-Langerhans-Zellen-Kulturmedium zur Pilzabwehr zugesetzt.

Blockpuffer für ELISA

1% (w/v) BSA in 1 x PBS

Buraton

Isopropanol 5,72 l

Glyoxal 9,2 g

Glyoxylsäure 1 g

Aqua dest. ad 10 l

Da die Salze schlecht löslich waren, wurde der Ansatz über Nacht auf dem Magnetprüher gelassen. Buraton wurde als Sterilium für alle keimfreien Zonen verwendet.

Calciumchlorid (CaCl_2) , (Roth, Karlsruhe)

Es wurden 10 g CaCl_2 in 500 ml 1 x PBS gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 220 µl pro Fell zur Isolation von epidermalen Zellen aus murinem Fell verwendet mit der Absicht, Ca^{2+} als Cofaktor für die DNase I zur Verfügung zu stellen.

Carboxymethylcellulose (no. 16110), (CMC, Serva, Heidelberg)

1% (w/v) CMC wurde ü.N. in Aqua dest. gelöst und als Suspensionsmittel für Leflunomid verwendet.

Citrat-Monohydrat (Sigma, Deisenhofen)

Es wurde eine 10 mMolare (2,1 g/l in 1 x PBS) Citrat-Monohydrat-Lösung hergestellt und der pH-Wert auf 4,5 eingestellt. Verwendung fand die Stammlösung beim ELISA-Test.

Citrat-Puffer

Lösung A: 18,9 g Citrat in 900 ml Aqua dest. gelöst

Lösung B: 3,56 g Na_2HPO_4 in 100 ml Aqua dest. gelöst

Der Citrat-Puffer setzte sich aus 900 ml Lösung A und 100 ml Lösung B zusammen und wurde auf einen pH-Wert von 2,6 eingestellt.

Concanavalin A (Con A, Sigma, Deisenhofen)

Con A ist ein pflanzliches Lektin, das polyvalent an T-Zell Oberflächenmoleküle bindet. Es wirkt als Mitogen stimulatorisch auf T-Lymphozyten. Eine Stammlösung von 2 mg/ml in 1 x PBS wurde angesetzt. Con A wurde zur Stimulierung von T-Zellen mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

DABCO-Histogel (Camon, Wiesbaden)

Es wurden 0,0125 g DABCO in 5 ml Histogel bei 37°C gelöst. Das Gel wurde lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und zum Eindeckeln von Epidermal Sheets benutzt.

Dimethylsulfoxid (DMSO; Roth, Karlsruhe)

Beim Einfrieren von Zellen wurde dem Medium 10 % (v/v) DMSO zugesetzt. Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften entzieht DMSO den Zellen während des Einfrierens Wasser und verhindert somit die Bildung zellschädigender Eiskristalle.

DNFB (2,4-Dinitrofluorbenzol; Sigma, Deisenhofen)

Es wurden verschiedene Konzentrationen dieses Allergens eingesetzt. Dazu wurde ein Gemisch aus 4 Teilen Aceton und 1 Teil Olivenöl hergestellt, in dem DNFB gelöst wurde.

Dispase (Grade II, Cat.-No. 165859, Boehringer, Mannheim)

Es handelt sich um eine neutrale Protease aus *Bacillus polymyxa*. Es wurde 0,1 g Dispase in 20 ml 1 x PBS gelöst. Die Dispaselösung benötigte man zur Isolation von epidermalen Zellen aus dem Fell. Die angegebene Menge bezieht sich auf ein Fell.

DNase I (Sigma, Deisenhofen)

Diese Desoxyribonuklease I (ca. 5000 I.U./ml in 1 x PBS) wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die DNase I benötigte man zur Isolation von epidermalen Zellen. Dazu wurden 90 µl der Stammlösung pro Fellansatz pipettiert.

Dynabeads[®] (M-450, Dynal A.S., Oslo, Norwegen)

Die in einer Konzentration von 4×10^8 /ml bezogenen Dynabeads waren mit einem Schaf-anti-Ratte-IgG gekoppelt. Diese paramagnetischen Polystyrolkugeln haben einen Durchmesser von 4,5 µm und sind somit nicht für FACS-Analysen geeignet. Sie wurden zur Isolation von Zellen aus Zell-Suspensionen verwendet. Zu diesem Zweck wurden sie mit einem Ratten-Antikörper gekoppelt und an einem Magneten getrennt.

Fluoresceinisothiocyanat (FITC Isomer I; Cat-No. F2,50-2, Aldrich, Steinheim)

Es wurden 0,2 mg in Aceton/Dibutylphthalsäure (1:1) gelöst und für Migrationsstudien verwendet.

Gentamycin (500 x, Boehringer, Mannheim)

Es wurden 0,05% Gentamycin dem 3d-Langerhans-Zell-Kulturmedium zur Pilzabwehr zugesetzt.

Gey's Lyse-Puffer (Fluka, Neu-Ulm)

Es wurden

8,29 g NH₄Cl

1 g KHCO₃

0,037 g EDTA pro Liter Aqua dest. gelöst.

Dieser Puffer diente zur Lyse von Erythrozyten in frisch präparierten Milzzellsuspensionen.

Glutamin (Roth, Karlsruhe)

Durch Lösen von 1,46 g L-Glutamin in 50 ml 1 x PBS wurde eine Stammlösung von 200 mMolar hergestellt. Dieser Ansatz wurde sterilfiltriert (0,2 µm), aliquotiert in 10 ml und bei -20°C eingefroren. Glutamin diente als Zusatz zu diversen Medien in einer Konzentration von 1% (v/v), da diese Aminosäure im Vergleich zu anderen Aminosäuren in Kulturmedien schneller abgebaut wird.

³H-Thymidin (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Die als sterile, wässrige Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 37 MBq/ml bezogene Methyl-Tritium markierte Thymidindesoxyribose wurde für Proliferationstests 1:100 bzw. 1:50 vorverdünnt und bei 4°C gelagert. Zur radioaktiven Markierung von Proliferationstests wurde beispielsweise von der Lösung 1:100 ein Tropfen pro well (ca. 10 µl, entspricht ca. 4,81 kBq/well) zugesetzt.

H₂O₂ (Fluka, Neu-Ulm)

Die 30%ige Stammlösung wurde entsprechend verdünnt eingesetzt.

Indomethacin (I-7378, Sigma, Deisenhofen)

Es wurde eine Stammlösung von 10mg/ml mit Ethanol abs. angesetzt und diente als Zusatz zum Proliferationsmedium in einer Konzentration von 0,01%.

Leflunomid (N-(4-trifluoro-methylphenyl)-5-methylisoxazol-4 carboxamide, HWA 486)

Dieses Isoxazolderivat sowie der aktive Metabolit A771726B wurden freundlicherweise von Dr. R.R. Barlett, Hoechst Marion Roussel AG, Werk Kalle-Albert, Wiesbaden zur Verfügung gestellt. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, in 1% CMC gelöst eingesetzt.

NaN₃ (2,5 M)

16,5 g NaN₃ wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Natriumpyruvat (Seromed, Heidelberg)

Es wurden 1,1 g Natriumpyruvat in 100 ml 1 x PBS gelöst. Diese Stammlösung von 100 mMolar wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4°C aufbewahrt. Na-Pyruvat wurde als 1%iger (v/v) Zusatz zu diversen Medien verwendet.

MACS Anti-FITC Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Cat-No. 487-01)

Diese Beads fanden für die indirekte Separation von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension Verwendung. Die Zellen wurden vorher mit einem DTAF-gekoppelten Anti-MHC II-Antikörper inkubiert. Bei dem auf den Beads gebundenen anti-FITC-Antikörper handelte es sich um einen Maus IgG1 Antikörper.

MACS Streptavidin Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Cat-No. 481-01)

Diese Beads wurden zur indirekten Separation von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension eingesetzt, nachdem die Zellen vorher mit einem biotinylierten anti-MHC II-Antikörper gekoppelt worden waren.

MACS Annexin V Microbeads (Dead cell removal kit, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Cat-No. 901-01)

Diese Beads wurden für die Entfernung von toten Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension verwendet. Nach Inkubation mit Annexin V Microbeads wurden die Zellen über eine LS⁺-Säule gegeben. Um MHC II-positive Zellen anzureichern, wurde die durchgelaufene Fraktion mit Antikörpern gefärbt.

MACS Annexin V Binding Buffer stock solution 20x (Dead cell removal kit, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Cat-No. 901-01)

Dieser Puffer wurde 1:20 mit Aqua dest. verdünnt und für den Gebrauch der MACS Annexin V Microbeads benötigt.

β-Mercaptoethanol (2-ME, Serva, Heidelberg)

Beim Ansatz verschiedener Kulturmedien wurde 1% (v/v) β-Mercaptoethanol von einer Stammlösung von 20 µl 2-ME in 5,7 ml 1 x PBS zugesetzt (Endkonzentration 5 x 10⁻⁵ M 2-ME). Dieser Zusatz diente zum einen als Oxidationsschutz, da 2-ME ein Reduktionsmittel ist, und zum anderen benötigten einige Zellen im Rahmen des Cystin-Stoffwechsels 2-ME als essentiellen Bestandteil.

Metrizamid (Sigma, Deisenhofen)

Für die Anreicherung von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension wurde ein 14,5%iger Metrizamid-Gradient verwendet. Dazu wurde Metrizamid in RPMI 1640 gelöst, und die Zellen wurden entsprechend mit RPMI aufgenommen.

Oxazolone (4-Ethoxymethyl-2-phenyl-2-Oxazolone; $C_{12}H_{11}NO_3$; Sigma, Deisenhofen)

Es kamen verschiedene Konzentrationen dieses Stoffes als Allergen zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurde Oxazolone in Aceton/Olivenöl (4:1) gelöst.

Paraformaldehyd (PFA, Merck)

Es wurden 1,4 g PFA in 200 ml 1 x PBS (0,7 % (w/v)) durch 45-minütige Inkubation bei 65°C im Wasserbad gelöst und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 7,0 eingestellt. Die PFA-Lösung benötigte man zur Fixierung von Zellen z.B. für FACS-Analysen.

PBS (phosphate buffered saline)

Für eine einfach konzentrierte Lösung wurden

40,2 g NaCl

7,8 g NaH_2PO_4

in 5 Liter destilliertem Wasser gelöst und mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,2 eingestellt.

Danach wurde die Lösung in Medienflaschen abgefüllt und autoklaviert.

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Boehringer Mannheim)

Eine Antibiotikallösung, bestehend aus 10^4 I.U./ml Penicillin und 10^4 µg/ml Streptomycin, wurde den Kulturmedien zum Schutz vor Kontamination 1 %ig zugesetzt.

Propidiumjodid (P-4170, Sigma, Deisenhofen)

Von diesem Farbstoff wurde eine Stammlösung von 100 µg/ml hergestellt und in der FACS-Probe eine Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Der Farbstoff fand für die Vitalitätsprüfung Verwendung, da er selektiv tote Zellen anfärbt.

10 x PBS

4,91 g KH_2PO_4

21 g Na_2HPO_4

81 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Renaissance® TSA-Direct Green-Tyramide signal amplification Kit

(DuPont NEN Research Products, Boston M.A., Cat-No. NEL701A)

Dieser Kit wurde für die Immunhistologie verwendet. Die Signalverstärkung erfolgte über ein DTAF-gekoppeltes Tyramid, das durch eine Radikalbildung zur spezifischen Anlagerung an die Zellwand gebracht wird.

Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin, Sigma, Deisenhofen)

Eine 1%ige Lösung in 1 x PBS wurde verwendet, um unspezifische Bindungsstellen an Plastikoberflächen beim ELISA oder bei Membranfiltern zu sättigen.

Substratlösung für ELISA

1 mg/ml ABTS, in Substratpuffer gelöst.

Substratpuffer für ELISA

10 mM Citratmonohydrat, pH 4,5 mit 10 N NaOH eingestellt.

Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe)

Die vorher getrockneten Glasfaserfilter wurden mit 10 ml der Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie eingeschweißt und im Thymidincounter gemessen.

Trypanblau (Roth, Karlsruhe)

Der Vitalfarbstoff Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet. Die Stammlösung aus 0,1 % (w/v) Trypanblau und 0,01 % Natriumazid (NaN_3) (w/v) in Aqua dest. wurde mit 10 x PBS im Verhältnis 9:1 gemischt und bei 4°C aufbewahrt.

Trypsin/EDTA (Trypsin 1:250, no. T-4799, Sigma, Deisenhofen)

Eine Trypsin/EDTA-Lösung wurde aus 0,25% (w/v) Trypsin sowie 0,1 % (w/v) EDTA in 1 x PBS hergestellt. Der Ansatz diente zum Lösen von adhären wachsenden Keratinozyten und zur Isolation von epidermalen Zellen aus der Haut.

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat; no. P-1379, Sigma, Deisenhofen)

Dieses Detergens wurde zur Herabsetzung der Oberflächenspannung in Emulsionen verwendet.

Tyramide Signal Amplification Puffer (DuPont NEN Research Products, Boston M.A.)**TNT-Puffer**

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,15 M NaCl

0,05% TWEEN 20

TNB-Puffer

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,15 M NaCl

0,5% Blocking Reagenz

Versen/EDTA

Es wurde eine 1000 ml Versen/EDTA-Lösung aus folgenden Reagenzien hergestellt:

1,0 mM EDTA 0,292 g/l

1,1 mM Glucose 0,198 g/l

2,6 mM KCl 0,193 g/l

1,4 mM KH₂PO₄ 0,190 g/l

136,8 mM NaCl 7,995 g/l

8,1 mM NaH₂PO₄ 1,15 g/l

Die Lösung wurde sterilfiltriert und zum Lösen von adhären wachsenden Zellen wie WEHI-164 verwendet.

Waschlösung für Antikörperfällung (Fluka, Neu-Ulm)

Es wurden 50 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ (250 g) und 0,1 M NaHCO₃ (4,2 g) in 500 ml Aqua dest. gelöst. Diese Stammlösung wurde als Waschlösung bei der Proteinfällung mit Ammoniumsulfat verwendet.

Waschpuffer für ELISA

0,1% (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylsorbitan-Monolaurat) in 1 x PBS

1.4.2 Reagenzien, Puffer und Lösungen der Molekularbiologie

AmpliQaq-Polymerase (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, M.D., Cat-No. 18038-018 oder AmpliQaq-Polymerase™ Gold, Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey)

Von diesen rekombinanten Taq-DNA-Polymerasen wurde eine Menge von 1 µl pro Ansatz in der PCR verwendet. Die Gibco-Polymerase war mit 5 I.U./µl konzentriert, die AmpliQaq-Polymerase™ Gold mit 8 I.U./µl konzentriert. Die AmpliQaq-Polymerase™ Gold lag inaktiv vor, damit beim Mischen der Ansätze keine Falschpaarungen auftreten konnten und mußte deshalb vor Gebrauch durch einen Vorzyklus (94°C für 11 Minuten) aktiviert werden.

Bromphenolblau

4 M Harnstoff

50% Saccharose

0,1 M Na₂EDTA

0,1 % Bromphenolblau

Zu einer DNA-Probe wurde vor dem Auftragen auf ein Agarosegel 20-30% Bromphenolblau hinzugegeben, um eine Lauffront auf dem Gel erkennen zu können.

DEPC-Wasser

Aqua dest. 500 ml

0,5% Diethylpyrocarbonat 500 µl

Der Ansatz wurde mindestens 60 Minuten auf dem Schüttler gelöst und autoklaviert.

dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GeneAmp RNA PCR Kit)

10 mM Desoxyribonucleosid-triphosphate

Elutionspuffer (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

10 mM Tris-HCl (pH: 7,5)

1 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung (Roth, Karlsruhe)

Zum Färben von DNA-Gelen wurde eine 1%ige EtBr-Lösung ad Aqua dest. verwendet.

Da EtBr cancerogen ist, wurde alles, was mit dem Stoff in Berührung kam, nur mit Handschuhen angefaßt.

Extraktionspuffer (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

Die wässrige Lösung enthielt GTC (Guanidin Thiocyanat) und N-lauroyl-Sarcosin zur Inhibition der RNasen.

Gene Amp RNA PCR-Kit

(Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey; Cat-No. N808-0017)

Dieser Kit wurde fertig bezogen und enthielt alle benötigten Reagenzien in der geeigneten Konzentration zur Durchführung einer reversen Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion.

Glycogenlösung (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

Es wurden 5-10 mg/ml Glycogen in DEPC-Wasser gelöst.

Hexanukleotide-Primer (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey; Cat-No. N808-0017)

Diese Primer stellen ein Gemisch aus Hexanukleotiden mit sämtlichen möglichen Kombinationen der Nukleotidsequenzen dar. Das Anbinden dieser Primer an die Zielsequenz findet statistisch verteilt statt, so daß die ganze mRNA-Kette transkribiert werden konnte.

High-Salt-Buffer (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

10 mM Tris-HCl (pH: 7,5)

1 mM EDTA

0,5 M NaCl

Kalium-Acetat-Lösung (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

2,5 M KaliumAcetat bei pH: 5,0

Low-Salt-Buffer (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification-Kit)

10 mM Tris-HCl (pH: 7,5)

1 mM EDTA

0,1 M NaCl

MgCl₂-Lösung (GeneAmp RNA PCR Kit)

Die Magnesiumionen (25 mM MgCl₂) wurden für die Enzymaktivität benötigt.

MuLV reverse Transkriptase (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey Cat-No. 808-0018)

Diese rekombinante RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem murinen Leukemia Virus verwendet einzelsträngige RNA mit Primern als Template für die Generierung von cDNA. Die reverse Transkriptase wurde mit 1 µl pro Ansatz eingesetzt und war mit 50 I.U./µl konzentriert.

Oligo-dT-Cellulose (QuickPrep-Micro-mRNA-Purification Kit)

Die Oligo-dT-Cellulose wurde in einer Konzentration von 25 mg/ml im Puffer mit 0,15% Kathon CG bezogen.

10 x PCR-Buffer II (GeneAmp RNA PCR Kit)

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl (pH: 8,3)

Der Puffer wurde für einen stabilen pH-Wert und zum Einstellen des Ionengleichgewichts benötigt.

Primer (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg)

Die Primer wurden von MWG-Biotech synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert geliefert.

Quick Prep mikro mRNA Purification Kit (Pharmacia, Uppsala; Cat-No. 27-9255-01)

Der verwendete Kit beinhaltet alle benötigten Reagenzien und Reaktionsgefäße für die Isolierung und Reinigung von mRNA.

RNase Inhibitor (Gene Amp RNA PCR Kit)

Der RNase-Inhibitor (20 I.U./ μ l) wurde bei der reversen Transkription benötigt.

10% SDS 250 ml

10% (w/v) SDS 25 g

20 x SSC 1000 ml

3 M NaCl 175,3 g

0,3 M Na₃-Citrat 88,2 g**20 x TBE** (Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer)

Es wurden

Tris 108 g

Borsäure 55,6 g

25 mM Na₂EDTA 4,65 gauf 500 ml mit H₂O aufgefüllt.**1 x TBE**

Tris 90 mM

Borsäure 90 mM

Na₂EDTA 1,2 mM**Tris, gesättigt** (Roth, Karlsruhe)

Tris wurde zu 50 ml H₂O so lange unter Rühren hinzugegeben, bis sich unlösliches Tris absetzte. Der pH-Wert wurde dann mit 10 N HCl auf 8,5 eingestellt.

 Φ X-174-RF/Hae III (Pharmacia, Uppsala)

Die DNA isolierte man von *E.coli*, die mit Φ X *am3 cs 70* infiziert worden waren. Die DNA wurde dann mit *Hae III* verdaut und als Markerbanden für die Gelelektrophorese verwendet.

1.5 Cytokine**rm IL-2**

Der Kulturüberstand von P3-X63Ag8.653 Myelomzellen, die mit dem Gen für murines IL-2 transfiziert wurden (176), wurde in der Konzentration von 0,3 % als Zusatz zu Kulturmedien eingesetzt.

Rattenmilzüberstand (Con A Sup)

Zur Produktion von IL-2 haltigem Con-A-Sup wurden Rattenmilzzellen gewonnen. Die Aussaat der Milzzellen erfolgte in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in 175 cm² Flaschen. Dem Kulturmedium aus IMDM, 2mM Glutamin und 0,5 μ /ml BSA wurden 10 μ g/ml Con A zugesetzt. Nach 20-24 stündiger Inkubation bei 37°C konnte der Zellüberstand geerntet, zentrifugiert und sterilfiltriert werden. Der Milzüberstand wurde bei -20°C gelagert. Con A Sup wurde als 7%iger Zusatz für Kulturmedien verwendet.

1.6 Seren als Zusätze für Kulturmedien

Als Quelle diverser, teilweise noch unbekannter Wachstumsfaktoren wurde den Puffern und Medien fötales Kälberserum (FCS, fetal calf serum) oder HS (horse serum) zugesetzt. Die Seren wurden von Gibco BRL (Eggenstein) und Serva (Heidelberg) steril und mycoplasmafrei bezogen. Vor Verwendung wurden sie für 30 Minuten auf 56°C erhitzt, um Complementfaktoren zu zerstören.

NMS i.a. (bezogen vom Tierstall des Institutshochhauses)

Das normale Mausserum wurde von BALB/cAnn Mäusen gewonnen und inaktiviert.

NKS i.a. (bezogen vom Tierstall des Institutshochhauses)

Das normale Kaninchenserum des Stammes New Zealand White wurde zum Absättigen von Fc-Rezeptoren auf Zellen, die bei der FACS-Analyse eingesetzt wurden, verwendet. Vor Gebrauch wurden die Komplementkomponenten durch Inkubation für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

1.7 Kulturmedien

Die Qualität des verwendeten Wassers ist von zentraler Bedeutung für den Erfolg einer Zellkultur. Für den Ansatz der folgenden Medien wurde daher nur Wasser aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (Millipore) oder über die Apotheke des Klinikums bezogenes Wasser verwendet. Nach dem Ansatz erfolgte eine Sterilfiltration über einem 0,2 µm Membranfilter. Bis zum Gebrauch wurden die Medien bei 4°C gelagert.

MEM (minimal essential medium)

Es wurden

9,526 g MEM-Trockenpulver (Gibco BRL, Eggenstein)

4,770 g HEPES (Roth, Karlsruhe)

10 ml/l (10^5 I.U., 10^5 µg/l) Penicillin/Streptomycin

und 1 ml/l (5×10^{-5} M) 2-Mecaptoethanol

pro Liter destillierten Wassers gelöst. Dieses Medium wurde nach Zusatz von 2% FCS zum Waschen von Zellen oder zur Aufbewahrung von Zellen im Kühlschrank benutzt, weil der pH-Wert konstant bleibt.

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)

Es wurden

17,67 g IMDM-Trockenpulver (Gibco BRL, Eggenstein)

3,02 g NaHCO_3

10 ml/l (10^5 I.U., 10^5 µg/l) Penicillin/Streptomycin

und 1 ml/l (5×10^{-5} M) 2-Mecaptoethanol

pro Liter destillierten Wassers gelöst. Dieses Medium wurde als Grundmedium zur Kultivierung aller Zellen verwendet.

RPMI-1640

Es wurden

10,42 g RPMI-1640 Trockenpulver (Biochrom, Berlin)

2 g NaHCO_3

10 ml/l (10^5 I.U., 10^5 µg/l) Penicillin/Streptomycin

und 1 ml/l (5×10^{-5} M) 2-Mecaptoethanol

pro Liter destillierten Wassers gelöst.

1.8. Spezielle Kulturmedien

Die Mengenangaben hinter dem Namen des Mediums sind als ad liquidum aufzufassen.

<u>9B11/12B9-Medium</u>	500 ml	<u>Proliferations-Medium</u>	200 ml
IMDM		IMDM	
5% FCS	25 ml	5% FCS	10 ml
1% Glutamin	5ml	1% Glutamin	2ml
0,3% IL-2 (X-63 Sup)	1,5 ml	0,01% Indometacin	20 µl
			(Stock: 10 mg/ml)
<u>Hybridom-Medium</u>	500 ml	<u>D10.G4.1-Medium</u>	500 ml
IMDM		IMDM	
5% (v/v) FCS	25 ml	5% FCS	25 ml
1% (v/v) Glutamin	5 ml	1% Glutamin	5 ml
1% (v/v) Pyruvat	5 ml	1% Pyruvat	5 ml
		7% SF (Con A Sup)	35 ml
<u>Waschmedium von Zellen</u>	500 ml	<u>CTLL-Medium</u>	500ml
MEM		Hybridom-Medium	
2% (v/v) FCS	10 ml	0,6% (v/v) X63-Sup-ÜS	3 ml
<u>3d-Langerhans-Zell-Medium</u>	200 ml	<u>FACS-Medium</u>	500 ml
IMDM		1 x PBS	
5% FCS	10 ml	2% (v/v) FCS	10 ml
1% Glutamin	2 ml	NaN ₃	0,01%
1% Penicillin/Streptomycin	2 ml	Dieses Medium wurde sterilfiltriert, um Partikel zu entfernen, die evtl. zu einer Verstopfung des FACS hätten führen können.	
0,1% Amphotericin B	400 µl		
0,05% Gentamycin	200 µl		

1.9 Antikörper

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Antikörper verwendet:

Die hier angegebenen Antikörper wurden entweder aus dem Zellüberstand der Hybridomkulturen gereinigt, mit (NH₄)₂SO₄ gefällt und ankonzentriert, oder der Überstand wurde direkt für Färbungen benutzt.

Zelle	Typ	Beschreibung
2G9	Ratte-anti-Maus I-A ^{d,b} , IgG2a;κ	Eur.J.Immunol., 1991, 21:1213.
MK-D6	Maus-anti-Maus I-A ^d , IgG2a;κ	J.Exp.Med., 1981, Vol.153:1198 (ATCC: HB3)
14.4.4 S	Maus-anti-Maus I-E ^{k/d/p/r} , IgG2a;κ	J.Immunol., 1980, Vol.124:533 (ATCC: HB 32)
M5/114.15.2	Ratte-anti-Maus I-A ^{b/d/q} , I-E ^{d/k} , IgG2b	J.Immunol., 1981, Vol.127: 2488 (ATCC: TIB 120)
GK1.5	Ratte-anti-Maus CD4, IgG2b	Immunol. Rev., 1983, 74:29
PC 61 5.3	Ratte-anti-Maus IL-2Rez.p55, IgG1	J.Exp.Med., 19, 160:1170
R17 217.1.3	Ratte-anti-Maus Transferrinrezeptor, IgG2a	Cell Immunol., 1984, 83:14
KM201	Ratte-anti-Maus CD44, IgG1	J.Exp. Med., 1990, 171:477
53.6.72	Ratte-anti-Maus CD8(α-Kette), IgG2a, κ	Immunol.Rev., 1979, 47:63

Neben diesen monoklonalen Antikörpern wurden für die Analyse im FACS bzw. für Epidermal Sheets weitere folgende Reagenzien verwendet:

Ratte-anti-Maus TNF-Rezeptor p55 (Klon HM 104, Cellsystems GmbH, Remagen)

Dieser monoklonale Antikörper des Isotyps Ratte IgG2a und wurde unmarkiert oder biotinyliert bezogen. Die Antikörperkonzentration betrug 0,1 mg/ml.

Ratte-anti-Maus TNF-Rezeptor p75 (Klon HM 102, Cellsystems GmbH, Remagen)

Dieser monoklonale Antikörper des Isotyps Ratte IgG2a und wurde unmarkiert oder biotinyliert bezogen. Die Antikörperkonzentration betrug 0,1 mg/ml.

Maus-anti-Maus I-A^b bio oder **I-A^b FITC** (06042D oder 06044D, IgG2a;κ, Pharmingen, Hamburg, 0,5 mg/ml).

Maus-anti-Maus I-A^d FITC (06034, IgG2a;κ, Pharmingen, Hamburg, 1 mg/ml)

Ratte-anti-Maus CD80 (B7-1) (01941D, IgG2a;κ, Pharmingen, Hamburg, 0,5 mg/ml)

YTS-154.7^{FITC} (Serolab, Berlin)

Dieser Rattenantikörper vom Isotyp IgG2b erkennt das Thy-1-Antigen und war direkt FITC-markiert (177). Er wurde in der Verdünnung von 1:100 eingesetzt und diente zum Nachweis von T-Zellen in Milzzellsuspensionen.

53.6.7-PE (anti-CD8α-R-PE, Dianova, Hamburg; Cat-No. 01045B)

Dieser Antikörper diente zum Nachweis der α-Kette von CD8 auf Zelloberflächen und war direkt mit R-Phycoerythrin gekoppelt. Es handelte sich um einen Ratte-anti-Maus-Antikörper vom Typ IgG2a, κ.

NLDC 145 (T-2013, BMA Biomedicals, Augst, CH)

Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen Ratte-anti-Maus-Antikörper vom Typ IgG2a. Er diente zum Nachweis von DEC-205.

Isotyp Maus IgG1 (no. 349040, Becton-Dickinson, Heidelberg)

Isotyp Ratte IgG2a (11021D, Pharmingen, Hamburg, 1 mg/ml)

Isotyp Ratte IgG2b (11021D, Pharmingen, Hamburg, 1 mg/ml)

Isotyp Maus IgG^{FITC} (107-02, Southern Biotechnology)

Maus-anti-Ratte IgG F(ab')₂^{DTAF} (Dianova, Hamburg, Cat-No.212-016-102)

Dieser Maus-anti-Ratte IgG Antikörper war DTAF-konjugiert und minimal kreuzreaktiv gegenüber Human-, Rinder-, Pferde- und Maus-Serum-Proteinen.

Maus-anti-Ratte IgG (H+L)^{bio} (Dianova, Hamburg, Cat-No.212-065-102)

Dieser Maus-anti-Ratte IgG Antikörper war biotinyliert und minimal kreuzreaktiv gegenüber Human-, Rinder-, Pferde- und Maus-Serum-Proteinen.

Ziege-anti-Ratte IgG^{R-PE} (no. 3030-09, Southern Biotechnology Ass., 1 mg/ml)

Dieser Ziege-anti-Ratte IgG-Antikörper war mit PE konjugiert.

Ziege-anti-Maus IgG + IgM (H+L)^{DTAF} (Dianova, Hamburg, Cat-No. 115-015-068, Lot. 23337)

Die Ziege-anti-Maus IgG- und IgM (H+L) -Antikörper waren DTAF-konjugiert und minimal kreuzreaktiv gegenüber Human-, Rinder- und Pferde-Serum-Proteinen.

Ziege-anti-Maus IgG (H+L)^{bio} (Dianova, Hamburg; Cat. 112-065-102, Lot. 24230)

Der Ziege-anti-Maus IgG (H+L) Antikörper war biotinyliert und minimal kreuzreaktiv gegenüber Human-, Rinder- und Pferde-Serum-Proteinen.

Ziege-anti-Maus IgG (H+L)^{TRITC} (Dianova, Hamburg, Cat-No. 115-025-062, Lot. 23017)

Der Ziege-anti-Maus IgG (H+L)-Antikörper war mit Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat (TRITC) konjugiert.

Ziege-anti-Ratte IgG^{Peroxidase} (Sigma, Deisenhofen, Cat-No. A9037)

Dieser IgG-Antikörper wurde in der Verdünnung von 1:100 für Immunperoxidasefärbungen von Cytospins verwendet und war mit HR-Peroxidase gekoppelt.

SA^{FITC} (Dianova, Hamburg, Cat-No. 016-010-084, 1 mg)

Streptavidin-Fluorescein-Isothiocyanat

SA-^{PE} (Becton-Dickinson immunocytometrie systems, San Jose; Cat. 349023, Lot 30524)
Streptavidin-Phycoerythrin mit Gelatine und 0,1% Azid.

SA-^{QR} (Sigma, St.Louis; Cat-No. S-2899, Lot. 082H-88941)
Streptavidin-Quantum Red

1.10 Mäuse

Es wurden Mäuse vom Genotyp BALB/c Ann(H-2^d) und C57BL/6 (H-2^b) verwendet. Die Zuchttiere stammten aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover und wurden im Tierstall des Institutshochhauses, Mainz weitergezüchtet und gekreuzt.

Außerdem kamen TNF-Rezeptor 1 (p55-Kette)- und TNF-Rezeptor 2 (p75-Kette)-defiziente Mäuse und die dazugehörigen Kontrolltiere zum Einsatz. Diese wurden freundlicherweise von Dr. H. Mossmann, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg und Dr. Pfeffer, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

1.11 Zelllinien und -Klone

D10.G4.1

Diese Th2-Zellen (178) stammen von AKR/J-Mäusen, die H-2^k restringiert sind. Sie zeigen ein IL-2-abhängiges Wachstum und wurden in einem Medium mit 7%igem Zusatz von Con A-Sup kultiviert. Die Zellen ließen sich mit Conalbumin als Antigen stimulieren. Außerdem reagierten sie alloreaktiv gegenüber Antigen-präsentierenden Zellen vom H-2^b-Typ.

BK-OVA-1R

Diese Th1-Zelllinie (179,180) vom Genotyp (B10xB10.BR) erkennt OVA in Verbindung mit (I-A^{b x k}) F1 MHC Klasse II-Molekülen. Die Zellen wuchsen IL-2 abhängig und wurden mit 0,6% rm IL-2 kultiviert.

L929

Diese Maus-Fibroblastenlinie (181) produziert M-CSF. Sie wurde im Hybridommedium kultiviert und für FACS-Studien verwendet.

WEHI-164

Diese murine Fibrosarcoma Zelllinie (182) wurde ursprünglich von Röllinghoff und Warner 1973 (183) etabliert. Die adhären wachsenden Zellen wurden in IMDM mit 5 % FCS kultiviert und für FACS-Analysen verwendet.

PAM 212

Es handelt sich bei dieser Zelllinie, die von Yuspa und Hawley-Nelson etabliert wurde, um einen Keratinozytentumor (184) aus BALB/c-Mäusen. Die Kultur der Zellen erfolgte im Hybridommedium. Die adhären wachsenden Keratinozyten wurden für FACS-Analysen verwendet.

CTL

Es handelte sich bei diesen Zellen ursprünglich um CTL, die ihre zytotoxischen Eigenschaften und ihre Antigenreaktivität verloren haben (185). Die Kultur erfolgte in IMDM mit 5 % FCS und 0,6 % rm IL-2. Die Zellen wurden für FACS-Analysen verwendet.

2 Methoden

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten (0,2 µm) Lösungen und sterilen Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden stets im Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂ und in gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert.

2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden je nach Dichte 1:2 oder 1:10 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau - Trypanblau färbte selektiv tote Zellen bläulich an - gezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Zellzahl von 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante (10⁴)

2.1.3 Bestrahlung der Zellen

Antigen-präsentierende Zellen, die in Proliferationstests oder bei der Restimulierung von T-Zellen nicht proliferieren sollten, wurden in einer Cäsium-Quelle mit 20 Gray (2000 rad) bestrahlt (1 Gray entspricht der aufgenommenen Strahlendosis von 1 Joule/kg Gewebe).

Die γ-Strahlen, charakterisiert durch kurze Wellenlängen und hohe Frequenzen, dringen tief ins Gewebe ein, führen aber zu einer relativ geringen Ionisierung, verglichen mit korpuskulärer Strahlung wie α- oder β-Strahlen. Die Wirkung auf die Zelle kann direkt erfolgen, wenn die Strahlung unmittelbar auf ein Makromolekül trifft oder indirekt, wenn sie zuerst mit Molekülen des Zellinneren - gewöhnlich mit Wassermolekülen - reagiert und dort Elektronen freisetzt, die ihrerseits auf andere Moleküle einwirken.

Es entstehen beispielsweise Doppelstrangbrüche in der DNA, die zur Folge haben, daß sich strahleninduzierte Bruchenden zu neuen Verknüpfungen verbinden. Die Folge davon sind abnorme Chromosomenformen wie dizentrische oder Ring-Chromosomen, die durch Inversionen, Translokationen und Deletionen entstehen.

Aber außer Doppelstrangbrüchen werden durch ionisierende Strahlen in der DNA noch zahlreiche andere Verknüpfungen erzeugt, z.B. covalente Verknüpfungen zwischen Basen, Verknüpfungen zwischen komplementären Basen, sogenannte cross-links, Einzelstrangbrüche und Strukturveränderungen der einzelnen Basen.

Die dabei entstandenen DNA-Strangbrüche verhindern eine DNA-Replikation und damit auch eine Proliferation der Zellen. Die Faktor-Produktion der bestrahlten Zellen wird bei geringen Strahlendosen kaum behindert (186).

2.1.4 Einfrieren von Zellen (Kryokonservierung)

Zuerst wurde der Kryokonservator (Nalgene™ Cryo 1°C freezing container) mit Isopropanol gefüllt und bei 4°C aufbewahrt. Dann wurden die einzufrierenden Zellen geerntet und gezählt. Pro Kryoröhrchen kamen ca. 1-1,5 Mio. Zellen in ½ ml Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) zum Einsatz. Sobald sich die Zellen im Kryo-Medium befanden, wurde auf Eis gearbeitet.

Die Röhren mit den Zellen wurden dann in den Kryokonservator umgesetzt und bei -80°C inkubiert, dabei wurden die Zellen um 1°C pro Minute abgekühlt. Nach ca. 1-2 Tagen wurden die Röhren auf die Halterungen der N_2 -Tanks gesteckt und in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

2.1.5 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden zuerst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension sofort mit einer gestopften Pasteurpipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Da die Zellen im Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO tiefgefroren wurden, mußte schonend das toxische DMSO entfernt werden. Dazu wurden tropfenweise 50 ml MEM 2% FCS (angewärmt) unter Schütteln der Zellsuspension zugegeben. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1200 Upm und 4°C zentrifugiert und im Kulturmedium aufgenommen.

2.1.6 Orale Applikation von Leflunomid

Leflunomid wurde in 1% CMC gegeben, und mittels Dispenser wurde eine Suspension hergestellt. Die Tiere erhielten alle 24 h, wenn nicht anders angegeben, entsprechend ihrem Körpergewicht 40 mg/kg Leflunomid mit Hilfe einer Magensonde. Es wurden 100 μl der Leflunomidsuspension pro Tier appliziert. Die Suspension wurde vor jeder Behandlung frisch angesetzt und mit Tween 20 benetzt.

2.1.7 Präparation von Milzzellen

Die von anhaftenden Geweberesten befreite Milz einer Maus wurde in 5 ml eiskaltes MEM 2% FCS überführt. Anschließend wurde sie in eine 6 cm-Petrischale gegeben und zwischen den rauhen Seiten zweier abgeflammter Objektträger zerrieben. Danach wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Petrischale mit MEM 2% FCS ausgespült. Nach 4-5 Minuten auf Eis hatten sich größere Zelltrümmer abgesetzt, und die oberen 4 ml wurden abgenommen und für 10 Minuten bei 4°C mit 1200 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.8 Präparation von Lymphknoten

Lymphknoten wurden steril präpariert und in MEM 5% FCS aufgenommen. Die Herstellung der Einzelzellsuspension ist mit der in 2.1.7 beschriebenen Milzzellpräparation identisch.

2.1.9 Adoptiver Transfer von Zellen

Für den adoptiven Transfer von immunkompetenten Zellen wurden den Donor-Tieren die Milz und distinkte Lymphknoten (L. maxillaris ant., L. maxillaris med., L. maxillaris post, L. axillaris supl., L. inguinalis supl.) steril entnommen und vereint. Nach der Zellvereinzelnung, entsprechend 2.1.7 und 2.1.8 durchgeführt, erfolgte für 2 Minuten die Inkubation der Zellen mit 3 ml Gey'schem Lysepuffer. Im Anschluß an einen Waschschrift mit MEM + 2%FCS wurden die Zellen über ein Zellsieb (100 μm) gegeben, um große Partikel zu entfernen. Danach wurden die Zellen gezählt und in 1 x PBS aufgenommen. Es wurde eine Konzentration von 1×10^8 Zellen pro 200 μl Volumen eingestellt. Vor dem Spritzen wurden

die Zellen ständig resuspendiert, um Verklumpungen zu verhindern. Es wurden 1×10^8 Zellen in einem Volumen von 200 μ l pro Maus i.v. in die Schwanzvene der Rezipienten mit einer Nadel (25G) gespritzt.

2.1.10 Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mittels Dynabeads

Die Isolierung von Milz, Lymphknoten und die anschließende Zellvereinzelnung wurden gemäß 2.1.7 und 2.1.8 durchgeführt. Die Zellen wurden mit MEM + 2%FCS gewaschen und mit 3 ml Gey'schem Lysepuffer versetzt. Nach 2 Minuten Inkubationszeit erfolgte die erneute Waschung und Zählung der Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit GK1.5 (anti-CD4) und 53.6.72 (anti-CD8) in einem Volumen von 10 ml ($1,5 \times 10^9$ Zellen) für 1 h bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Die Antikörper wurden über Ammoniumsulfatfällung ankonzentriert und der GK1.5 in einer Verdünnung von 1:100 bzw. der 53.6.72 in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Inzwischen wurden die Dynabeads dreimal mit 1 x PBS + 2%FCS gewaschen und dann in einem Verhältnis von 3 Beads pro Zielzelle eingestellt. Nach der Zentrifugation erfolgte die Inkubation der Zellen zusammen mit den Beads in einem Volumen von 3 ml (4×10^8 Zellen) für 30 Minuten bei 4°C auf dem Taumler. Anschließend erfolgte die Trennung der Zellen am Magneten. Die restliche Zellfraktion wurde dreimal mit 1 x PBS + 2%FCS gewaschen. Um Zellverklumpungen zu entfernen, wurden die CD4⁺- bzw. CD8⁺-depletierten Zellen nun über ein Zellsieb gegeben und gezählt. Die Zellen wurden dann in 1 x PBS aufgenommen und gemäß 2.1.9 1×10^8 Zellen pro Rezipient i.v. gespritzt.

Der Erfolg der Depletion der CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen wurde mit dem FACS überprüft. Dazu wurde die separierte CD4⁺- bzw. CD8⁺-Fraktion mit GK1.5, 53.6.72 und den entsprechenden Isotyp-Antikörpern inkubiert. Die Färbung erfolgte über den Sekundärantikörper Maus-anti-Ratte IgG^{DTAF}.

2.1.11 Isolierung von epidermalen Zellen aus muriner Haut

Nach Töten der Maus wurde zuerst ventral ein Schnitt in die Haut vorgenommen. Dieser wurde dann in die Vorder- und Hinterextremitäten verlängert, danach die Maus umgedreht und das Fell von den Extremitäten her abgezogen. Dabei wurden teilweise die Ohren auch präpariert.

Die Fellpräparation wurde auf a priori mit Buraton sterilisierten Präpariermatten vorgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C oder auf Eis.

Die Fellunterseite wurde mit Pinzetten von Fett- und Geweberesten befreit und dann kurz in 70% Isopropanol getaucht. Die Ohren wurden mit Pinzetten gesplittet. Das Fell wurde anschließend zweimal in 1 x PBS gewaschen und in 1-2 cm breite Streifen geschnitten. Die Streifen und die Ohrhälften wurden über Nacht bei 4°C in Dispase-Lösung eingelegt. Pro Fell wurde 0,1g Dispase in 20 ml 1 x PBS gelöst.

Am nächsten Tag wurde zunächst pro Fell 0,05 g Trypsin in 20 ml 0,1% EDTA-Lösung gegeben und auf 37°C erwärmt. Die Dispase-Lösung mit dem Fell und den Ohren wurde dann durch ein Teesieb abgegossen und zwei- bis dreimal mit 1 x PBS gespült. Die Fellstreifen bzw. Ohren wurden in die Trypsin-Lösung eingelegt und für 30 Minuten bei 37°C und 150 Upm im Aerotron inkubiert. Danach wurden pro Fell 10% HS (v/v) und 220 μ l CaCl₂ hinzugegeben, um Cofaktoren für die DNase I zur Verfügung stellen zu können. Anschließend wurden 90 μ l DNase I hinzupipettiert. Die DNase I hatte die Aufgabe, DNA-Fäden in der Lösung, die durch die Präparation entstanden waren und zur Zelladhäsion führten, zu zerschneiden. Es folgte wieder eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C und 150 Upm im Aerotron.

Dann wurden die Fellstreifen und Ohrhälften über einem Teesieb abgessogen, und der Durchlauf wurde im Erlenmeyerkolben aufgefangen.

In einer Petrischale erfolgte nun die Trennung der Dermis von der Epidermis. Die Dermis wurde mit Waschlösung (PBS + 2% HS) benetzt und sanft mit zwei Pinzetten abgestreift. Die Waschlösung wurde mit dem Durchlauf vereinigt. Die Epidermis wurde mit Pinzetten in einer Petrischale zerzupft und die Waschlösung über ein feinmaschiges Sieb mit dem Durchlauf vereinigt. Der Durchlauf wurde anschließend noch einmal über einem Milzsieb filtriert, wobei alle Gefäße und Siebe mit 5 ml-Pipetten abgespült wurden, da die epidermalen Zellen stark adhärent waren. Die Zellsuspension wurde dann in 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgefüllt und 15 Minuten lang bei 4°C mit 1500 Upm zentrifugiert. Das Pellet war stark adhärent und fädig. Gegebenenfalls wurden noch einmal 90 µl DNase I pro Fell hinzugegeben. Dann wurde das Pellet in Waschlösung mit 5 ml-Pipetten resuspendiert, erneut zentrifugiert, in 20 ml MEM 2% FCS aufgenommen und schließlich die Zellzahl bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die epidermalen Zellen bei 4°C aufbewahrt.

2.1.12 Anreinigung von T-Zellen über Nylonwoll-Säulen

Diesem *Modus operandi* liegt die Tatsache zugrunde, daß bei einer heterogenen Zellsuspension, wie sie z.B. bei einer Milzpräparation auftritt, Makrophagen und B-Zellen an der Nylonwolle zurückgehalten werden, während T-Zellen die Nylonsäule ohne Verweildauer passieren. Um den Anreicherungsgrad der T-Zellen zu erhöhen, wurden vorher die Erythrozyten mit Gey'scher Lösung lysiert. Die so angereicherten T-Zellen wurden für primäre Proliferationstests verwendet.

Durchführung:

Zunächst wurde 0,6 g Nylonwolle, die vorher sorgfältig mit Pinzetten zerzupft wurde, um evtl. vorhandene Knoten aufzulösen, in eine Säule gestopft, die wiederum in eine Hülle gesteckt wurde. Nach dem Autoklavieren wurden auf die Säule in der Hülle 20 ml auf 37°C vorgewärmtes MEM + 2% FCS gegeben und mit einem sterilen Spatel alle Luftblasen aus der Nylonwolle herausgedrückt. Das Volumen der Nylonwolle wurde dabei auf ca. 6 ml verringert. Die so behandelte Säule wurde im Wasserbad bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Milz, wie oben angegeben, präpariert, die Zellen gezählt und in MEM + 2% FCS aufgenommen. Es wurden maximal ca. 300×10^6 Milzzellen pro Nylonsäule eingesetzt.

Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurden max. 1×10^8 Zellen in 1 ml Gey'scher Lösung aufgenommen, resuspendiert und 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit MEM + 2% FCS auf 10 ml aufgefüllt und 10 Minuten lang mit 1200 Upm bei 4°C erneut zentrifugiert. Die Säule wurde nun mit einer sterilen Pinzette aus der Hülle genommen und mit 20 ml auf 37°C vorgewärmtes MEM + 2% FCS gespült. Anschließend wurde sie wieder in die Hülle zurückgesetzt. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes MEM + 2% FCS wurden sie auf die Mitte der Säule mit einer 1 ml Pipette aufgetropft. Sofort danach wurden nochmals 0,5 ml vorgewärmtes MEM + 2% FCS aufgetragen und 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zum Eluieren der T-Zellen wurde ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit Buraton sterilisiert und der Deckel mit einer 0,7 x 33 mm Kanüle durchstoßen. Die Spritze nahm man aus der Hülle und setzte sie auf die Kanüle. Nach dem Auftragen von 20 ml auf 37°C vorgewärmtes MEM + 2% FCS wurde die Tropfgeschwindigkeit des Eluats durch Drehen des Deckels auf eine

Tropfgeschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde eingestellt. Schließlich erfolgte die Zentrifugation der Zellen 10 Minuten lang bei 1200 Upm und 4°C sowie anschließender Zählung.

2.1.13 Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension mittels Dynabeads

Wie in Punkt 2.1.11 beschrieben, wurde zuerst über Dispaseverdau und anschließender Trypsinierung eine epidermale Zellsuspension gewonnen. Da in einer epidermalen Zellpopulation nur 1-3% Langerhans-Zellen (187) enthalten sind, ist es beispielsweise für eine mRNA-Gewinnung erforderlich, diese zu isolieren. Dazu wurde sich die Tatsache zunutze gemacht, daß Langerhans-Zellen die einzigen Zellen der Epidermis sind, die konstitutiv MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren.

Bei dieser Methode wurden mit einem Schaf-anti-Ratte IgG-Antikörper gekoppelte paramagnetische Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 4,5 µm verwendet. Der Schaf-Antikörper kann an Anti-MHC II-Antikörper der Ratte binden, die ihrerseits die MHC II-positiven epidermalen Zellen aus der Population heraus selektieren. So kann je nach Mausstamm ein spezifischer Antikörper gewählt werden. Zur Isolation von Langerhans-Zellen des Typs H-2^d wurden Antikörper vom 2G9-Hybridom verwendet. Nach einer relativ kurzen Inkubationszeit der Zellsuspension mit den Dynabeads können die gebundenen Langerhans-Zellen einfach durch Anlegen eines Magnetfeldes von den übrigen Zellen abgetrennt und ohne Zentrifugationsschritt gewaschen werden. Durch die Anreicherung von Langerhans-Zellen mit Beads kann eine max. 97 %ige Reinheit erreicht werden (187).

Durchführung:

Zunächst wurden folgende Berechnungen durchgeführt:

Aus 5 BALB/c-Fellen konnten durch Dispase-Verdau und Trypsinierung ca. 500×10^6 epidermale Zellen gewonnen werden, von denen ca. 15×10^6 (3%) Langerhans-Zellen waren. Es kamen pro Langerhans-Zelle 5 Dynabeads zum Einsatz. Somit wurden insgesamt 75×10^6 Beads für die Isolierung benötigt. Bei einer Konzentration von 4×10^8 Beads/ml mußten 187,5 µl aus der Dynabeads-Lösung entnommen werden.

Es war erforderlich, die Isolierung mit Dynabeads ca. 3 h vor der Präparation der epidermalen Zellen anzusetzen, da zuvor die Beads mit den anti-MHC II-Antikörpern inkubiert werden mußten. Wie oben berechnet, wurden 187,5 µl Magnetbeads entnommen, in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und zwecks Entfernung des Natriumazids, das zur Konservierung nötig war, dreimal in 5 ml 1 x PBS + 2%HS gewaschen. Dann wurden die Beads zum Trennen in einen Magneten gestellt, und mit einer Pipette wurde das Waschmedium abgesaugt.

Anschließend wurden 7 ml 2G9-Kulturüberstand auf die Beads gegeben und für 3-4 h bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. In der Zwischenzeit konnte die Gewinnung der epidermalen Zellen durchgeführt werden.

Nach der Kopplung der Beads mit den 2G9-Antikörpern erfolgte die Trennung der Beads mittels Magneten und die zweimalige Waschung mit 5 ml 1 x PBS + 2% HS.

Das Flüssigkeitsvolumen, in dem die Inkubation vorgenommen wurde, betrug bei 100×10^6 epidermalen Zellen 7 ml. Entsprechend wurden 500×10^6 Zellen mit 75×10^6 Beads in 35 ml Flüssigkeitsvolumen (1 x PBS + 2% HS) inkubiert und nicht verwendete Dynabeads verworfen.

Während die Zellen mit den Beads bei 4°C auf dem Taumler inkubiert wurden, konnte die in der Zellsuspension vorhandene DNA durch Zugabe von 100 µl DNase I zerstört werden.

Nach ca. 1 h Inkubationszeit konnten die Langerhans-Zellen nun mit Hilfe eines Magneten

separiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dreimaligem Waschen konnten die mit Beads gekoppelten Langerhans-Zellen in 5 ml Langerhans-Zell-Kulturmedium überführt werden. Unter einem Mikroskop wurde schließlich die Anzahl der toten/lebendigen und rosettierten/nicht-rosettierten Zellen bestimmt. Je nach Bedarf wurden die Langerhans-Zellen für die Isolierung von mRNA oder zur Kultur in Mikrotiterplatten verwendet.

2.1.14 Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension mittels MicroBeads (MACS) nach vorheriger Entfernung der toten Zellen

Die frisch isolierten oder kultivierten epidermalen Zellen wurden, wie vorher schon beschrieben, aus Mäusehaut gewonnen. Die toten Zellen wurden mittels Annexin V Beads aus der Suspension entfernt. Diese Beads waren mit dem Protein Annexin V, was mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet, beschichtet. Phosphatidylserin ist normalerweise in der cytosolischen Komponente der Zellwand integriert. Erst eine Beschädigung der Zellwand, Nekrose oder Apoptosis, macht Phosphatidylserin für die Bindung von Annexin V Beads zugänglich, indem eine Umlagerung von der inneren Plasmamembranwand zur äußeren erfolgte. Im Gegensatz zu Propidiumjodidfärbungen konnten über diese Methode zusätzlich frühe apoptotische Zellen isoliert werden. Die toten Zellen mit den Annexin V Beads wurden vom Magneten in der Trennungssäule zurückgehalten, und die durchgelaufene Fraktion wurde mit Anti-MHC II-Antikörpern gefärbt, die entweder biotinyliert oder mit FITC gekoppelt waren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit MACS Streptavidin-Beads oder MACS Anti-FITC Beads. Mit Hilfe des Magneten und der Trennungssäulen konnten letztendlich viable MHC II-positive Zellen in einer Reinheit von 94-98% gewonnen werden.

Durchführung:

Nach einem Waschschrift in 1 x PBS + 2% FCS wurde die Zellsuspension über zwei gestopfte Pasteurpipetten gegeben, um Zellverklumpungen herauszufiltern. Nach einem erneuten Waschschrift konnten die Zellen gezählt und bei RT mit Annexin V Beads inkubiert werden. Es kamen 100 µl Annexin V beads à 1 x 10⁷ Gesamtzellzahl zum Einsatz. Nach 15 Minuten wurden 500 µl kalter 1 x Annexin V-Puffer hinzugefügt, und die Zellsuspension wurde auf eine MACS LS⁺ Säule mit Nadel (22G) gegeben. Nach Auffangen der Durchlauffraktion wurde diese erneut auf eine frische LS⁺-Säule gegeben, und mittels Farbstoff Trypanblau erfolgte die Zählung der Zellen. Die Fc-Rezeptoren der so gewonnenen Zellen wurden anschließend für 10 Minuten mit 10 µl Maus IgG1 Antikörpern abgesättigt. Danach konnten die Zellen mit Maus-anti-Maus I-A^{b_{bio}} (1:100) oder Maus-anti-Maus I-A^{b_{FITC}} Antikörpern (1:100) für 15 Minuten inkubiert werden. In einem Waschschrift erfolgte die Entfernung überschüssiger Antikörper. Bevor die Zellsuspension weiter separiert werden konnte, mußten die Streptavidin-Beads bzw. Anti-FITC Beads mit den Zellen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert werden. Es wurden 10 µl Beads per 10⁷ Gesamtzellen verwendet. Nach einem erneutem Waschschrift und der Zugabe von 500 µl Waschpuffer wurde die Zellsuspension auf eine "Large cell separation"-Säule gegeben. Nach der Eluation wurde die Säule vom Magneten genommen, und die positiven Zellen konnten mittels Stempel und 3 ml Puffer von den ferromagnetischen Kügelchen separiert werden. Die so gewonnenen Zellen wurden auf eine zweite Säule gegeben und nach der Eluation erneut von dieser getrennt. Um die Effektivität der Reinigung im FACS zu testen, wurden von allen Fraktionen Zellproben entnommen und mit Antikörpern gefärbt. Die letztendlich gewonnenen Zellen konnten dann zwecks Untersuchung der Oberflächenmolekülexpression im FACS oder für die Gewinnung von mRNA verwendet werden.

2.1.15 FACS-Analyse von Zellen

Diese analytische Methode wurde unter dem Gesichtspunkt der Charakterisierung von Oberflächenmolekülen auf murinen Zellen eingesetzt.

Bei der indirekten Fluoreszenz wurden die Zellen mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Nicht-gebundenes Immunglobulin wurde mittels FACS-Puffer ausgewaschen. Der Primärantikörper konnte mit einem speziesspezifischen Fluorochrom-markierten Anti-Immunglobulin nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Biotin-markierten Primärantikörpern erfolgte der Nachweis durch Zugabe von DTAF-, Phycoerythrin (PE) oder Quantum Red-konjugiertem Streptavidin. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, um das "Capping" und endozytotische Internalisierungen der Oberflächenmoleküle zu verhindern.

Um signifikante Aussagen über die Bindung der Primärantikörper an spezifische epidermale Zellpopulationen wie z.B. Langerhans-Zellen machen zu können, wurden Doppelfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Dazu mußte zunächst die betreffende Zellpopulation mit einem spezifischen Marker charakterisiert werden. Langerhans-Zellen wurden mit Anti-MHC II-Antikörpern nachgewiesen, da sie als einzige Zellen der Haut konstitutiv MHC II-Moleküle exprimieren. Die MHC II-positiven Zellen wurden dann mit DTAF- oder FITC-markierten Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle, die wiederum biotinyliert waren. Als Sekundärfluoreszenz wurde Streptavidin-Phycoerythrin gewählt, weil beide Fluorochrome mit einem 488 nm-Argon-Laser angeregt werden können, aber Licht in verschiedenen Wellenlängen emittieren. Die mit FITC- oder DTAF-markierten MHC-positiven Zellen konnten schließlich über die CellQuest™-Software selektiv auf Sekundärfluoreszenzen hin untersucht werden.

FITC emittiert Licht bei 520 nm, während R-PE seinen Emissionspeak bei 575 nm hat. DTAF verhält sich in bezug auf die Emission wie FITC, hat aber den Vorteil, sich bei längerer Lagerung der Proben stabiler zu verhalten. DTAF wurde im Kanal 1 (FL1) und PE im Kanal 2 (FL2) des FACS gemessen. Quantum Red wurde bei 596 nm angeregt und emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 620 nm. Dieser Farbstoff konnte aus diesem Grunde nur im Kanal 3 (FL3) gemessen werden. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden von drei Photomultipliern detektiert und entsprechend den Fluoreszenzkanälen aufgenommen. Die Photodetektoren konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Stärke der Lichtsignale korreliert. Die Prozessierung der auf die Photomultiplier auftreffenden Signale erfolgt mit einer Auflösung in 1024 Kanäle bei allen fünf Parametern (zwei Streulicht und drei Fluoreszenzsignale). Eine mögliche Signalverstärkung ist abhängig von der Dynamik des Meßbereichs und kann linear oder logarithmisch über einen Bereich von vier Dekaden erfolgen.

Die Isotypkontrollen dienen zur Justierung der Empfindlichkeit des Durchflußzytometers. Aufgrund dieser Ansätze wurden später die Marker für die statistische Analyse der Daten festgelegt. Der positive Ansatz diente der eigentlichen Erfassung der Meßwerte.

Die Messung erfolgte stets nach Ausgrenzung von Aggregaten und toten Zellen über Größe (FSC) und Granulierung (SSC). Es wurden meist 3000-10000 Ereignisse je Probe gemessen und mit der CellQuest™-Software des Gerätes analysiert. Bei Verwendung von Doppelfluoreszenzen wurden stets ein doppelt-negativer Ansatz sowie zwei einfach-positive Ansätze gemacht. Der doppelt-negative Ansatz diente zur Justierung der Empfindlichkeit des FACS. Aufgrund dieses Ansatzes wurden später die Quadrantenmarker für die statistische Analyse

der Daten festgelegt. Mit Hilfe der einfach-positiven Ansätze wurde die Kompensation des FACS durchgeführt. Der doppelt-positive Ansatz diente zur eigentlichen Erfassung der Meßwerte.

Weiterhin wurde Propidiumjodid zur Vitalitätsfärbung der Zellen verwendet. PJ emittierte Licht, das sowohl in Kanal 2 als auch in Kanal 3 gemessen werden konnte. In diesem Falle bedurfte es einer weiteren Kompensation.

Durchführung:

Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (bei 4°C, 1200 Upm für 10 Minuten) und mit MEM + 2% FCS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl und Aufnahme der Zellen im FACS-Medium wurde eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Pro FACS-Röhrchen wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Fc-Rezeptoren nach Zentrifugation der Polypropylen-Röhrchen mit NMS oder Maus IgG1 Antikörpern bei 4°C 10 Minuten lang bei 1200 Upm für 30 Minuten abgesättigt.

Danach wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Medium gewaschen, abzentrifugiert und in 50 µl der Antikörper-Verdünnung aufgenommen. Nach einer wiederholten Durchmischung wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gestellt, wobei sie alle 10 Minuten erneut aufgewirbelt wurden.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Medium gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper-Lösung resuspendiert. Dieser Antikörper hatte die Aufgabe, spezifisch den Primär- oder Sekundär-Antikörper zu binden (z.B. Wenn es sich um einen Maus IgG-Antikörper als Primär-Antikörper handelte, wurde ein anti-Maus IgG-Antikörper - gekoppelt mit FITC - als Detektions-Antikörper verwendet.)

Die Proben wurden bei Dunkelheit für 30 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml FACS-Medium wurden die Zellen abzentrifugiert und in ½-1 ml 0,7% Paraformaldehyd aufgenommen. Bei Verwendung von Propidiumjodid wurden die Zellen im FACS-Medium aufgenommen, mit 20 µl der Propidiumjodid-Stammlösung (100 µg/ml) versetzt und anschließend durchmischt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C.

Bei Doppelfärbungen wurde ein zweiter Primär- und ein dazu passender zweiter Sekundärantikörper unter den gleichen Färbebedingungen verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, daß die beiden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammten und daß sich die Farben der Fluoreszenzmarkierung unterschieden. Außerdem durften die Sekundärreagenzien nicht miteinander kreuzreagieren. Die Proben wurden anschließend gemessen und die Färbungen über die CellQuest™-Software kompensiert, weil sich die Fluoreszenzspektra von beispielsweise FITC und Phycoerythrin teilweise überlappen. Bei Verwendung der Fluorochrome FITC und Quantum Red war eine Kompensation nicht nötig, da es einen nur geringen überlappenden Fluoreszenzbereich gibt.

2.1.16 Immunglobulin-ELISA

Zum quantitativen Immunglobulinnachweis fand die Methode des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Verwendung. Bei der indirekten (sandwich) Methode wurden zunächst an die Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte polyklonale anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelt und dann die freien Bindungsstellen der Platte durch BSA abgesättigt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der zu testenden Lösung. Die an den Primärantikörper gebundenen

Immunglobuline konnten nachfolgend durch einen speziesspezifischen Peroxidase-konjugierten anti-Immunglobulin-Antikörper nachgewiesen werden. Die Bildung des Komplexes wurde über eine Farbreaktion bei der Umsetzung des Substrats durch das Enzym nachgewiesen. H_2O_2 als Substrat der Peroxidase wurde dabei vom Enzym zum Radikal gespalten, das wiederum das Chromogen ABTS von einem hellgrünen zu einem dunkelgrünen Farbton hin oxidierte. Die resultierende Farbänderung war im ELISA-Reader photometrisch bei 414 nm meßbar.

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl/well der Primärantikörperlösung beladen und 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Ausklopfen der Lösung wurden die freien Bindungsstellen der Plastikoberfläche durch Zugabe von 150 µl/well Blockpuffer für 2 h bei 37°C abgesättigt. Danach wurden die Platten erneut ausgeklopft, und 50 µl/well der zu testenden Überstände wurden für mindestens ½ h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer und Ausklopfen wurden 50 µl/well des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers hinzugefügt. Die Platte wurde für mindestens ½ h in den Brutschrank bei 37°C gestellt und dann erneut dreimal gewaschen. Inzwischen wurde 1 mg/ml ABTS in 10 mM Citratpuffer (pH auf 4,5 eingestellt) gelöst und pro ml Substratlösung mit 10 µl einer 1%igen H_2O_2 -Lösung versetzt. Schließlich wurden 50 µl/well der Substratlösung auf die Platte gegeben, und die dunkelgrüne Färbung wurde bei 414 nm gemessen. Als Nullabgleich diente dabei 1 x PBS, das in einigen Wells anstelle der antikörperhaltigen Überstände pipettiert wurde. Bei der Auswertung wurde von jeweils drei Werten der Mittelwert errechnet.

2.1.17 Ammoniumsulfatfällung und Entsalzung gefällter Immunglobuline

Die Salzfällung stellt eine einfache Standardmethode zur Anreicherung monoklonaler Antikörper aus Lösungen dar. Dabei verringern die zugesetzten anorganischen Salze, die für die Löslichkeit von Proteinen notwendig sind, die Dipolwechselwirkungen von Oberflächenamino-säuren mit dem Lösungsmittel. Beim Zusatz hoher Konzentrationen von Ammoniumionen und Sulfationen kommt es so zu einer Konkurrenz der Ionen und der in der Lösung befindlichen Proteine um die Bindung von Wasser. Dadurch werden Wassermoleküle von den Proteinen entfernt, wird die Löslichkeit vermindert und somit die Präzipitation der Proteine erreicht. Die Salzkonzentrationen, bei denen Antikörper ausfallen, variieren speziesspezifisch und sind zudem abhängig von der jeweiligen Antikörperklasse. So fallen IgM schon bei einer Salzkonzentration von unter 30% (v/v) einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung im Ansatz aus. Alle anderen Antikörper präzipitieren erst in einem Bereich von 35-50% Salzkonzentration. Die meisten Serumkomponenten fallen oberhalb einer 50%igen Salzsättigung aus, so daß eine Ammoniumsulfatfällung neben seiner Ankonzentrationsfunktion auch zu einer Vorreinigung monoklonaler Antikörper einsetzbar ist. Zu beachten bleibt in diesem Zusammenhang, daß die gefällten Immunglobuline nicht vollkommen rein sind, da weitere hochmolekulare Proteine, die im Kulturmedium enthalten sind, ebenfalls präzipitiert werden. Aus diesem Grund wurde der FCS-Anteil im Kulturmedium von antikörperproduzierenden Zellen auf 1-2% verringert.

Durchführung:

Sämtliche ankonzentrierte Immunglobuline wurden mittels Ammoniumsulfat gefällt, wobei die Ammoniumsulfatsättigung von dem FCS-Anteil im Kulturüberstand abhängig war.

Dem Zellkulturüberstand wurde auf Eis, da die Proteine sonst leicht denaturieren, pro Liter 313g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50%ige Salzlösung) langsam und unter ständigem Rühren zugegeben und über Nacht bei 4°C gefällt. Die langsame Salzzugabe ist von Bedeutung, um eine vorübergehende, zu hohe lokale Ammoniumsulfatkonzentration in der Lösung zu vermeiden. Die gefällten Proteine wurden dann abzentrifugiert, mit Waschlösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in einer kleinen Menge 1 x PBS wurden unlösliche Bestandteile, die sich störend auf die nachfolgende Gelfiltration hätten auswirken könnten, durch Zentrifugation entfernt. Die hier zwecks Entsalzung durchgeführte Gelfiltration stellt ein chromatographisches Verfahren dar, das auf der Trennung gelöster Substanzen nach ihrer Molekülgröße beruht. Dabei treten die großen Moleküle, die die Gelperlen umfließen, zuerst im Eluat in Erscheinung, während kleinere Moleküle von unter 5000 Da, z.B. die Ammoniumionen und Sulfationen, die durch die Poren ins Gellinnere eindringen können, eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Nach Equilibrierung einer PD10-Säule mit 25 ml 1 x PBS wurden genau 2,5 ml der gefällten Antikörperlösung auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde verworfen und nach Zugabe von 3,5 ml 1 x PBS die eluierte antikörperhaltige Fraktion aufgefangen und sterilfiltriert. Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgte mittels Immunglobulin-ELISA.

2.1.18 Ultrafiltration von antikörperhaltigen Kulturüberständen mit der Amiconzelle

Bei Kulturüberständen von antikörperproduzierenden Zellen mit kleinem Volumen ist eine Proteinfällung mit Ammoniumsulfat meist zu aufwendig. Oft reicht eine Ankonzentration über eine Filtermembran aus. Dazu werden mit einem Manometer ca. 3 bar Druck an das Gerät gelegt. Die Wahl der Filtermembran hängt von dem zu erwartenden Molekulargewicht der Antikörper und der im Medium enthaltenen Substanzen ab. Es wurde ein Filter vom Typ PM30 verwendet, d.h. alle Substanzen, die ein größeres Molekulargewicht als 30.000 Da hatten, wurden zurückgehalten.

Durchführung:

Zuerst wurden 100 ml 1 x PBS auf die Membran gegeben und 10 Minuten lang ohne Druck von der Amiconzelle gerührt, um die Membran von evtl. vorhandenen Proteinen zu befreien. Zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurden danach 50 ml 1 x PBS mit 1% BSA auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Kulturüberstand aufgetragen und bis auf 10 ml Volumen eingeeengt. Die Amiconzelle wurde dann so lange mit neuem Kulturüberstand aufgefüllt, bis der gesamte Kulturüberstand auf ein Volumen von ca. 10 ml eingeeengt war. Der konzentrierte Überstand wurde anschließend gewaschen, indem man ca. 150-200 ml 1 x PBS auf die Membran gab. Die durchgelaufene Fraktion wurde aufgefangen, da die Filtermembran hätte reißen können. Die eingeeengte Antikörperlösung wurde schließlich abgehoben, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Danach wurde die Filtermembran für 24 h in Aqua dest. eingelegt und im Anschluß daran in 70% Ethanol bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

2.1.19 Präparation von Epidermal Sheets und Immunfärbung von epidermalen Zellen

Diese Methode (188) wurde zum Nachweis von Oberflächenmolekülen auf Zellen, die sich noch im Gewebsverband befanden, benutzt. Der Vorteil dieser Präparation ist, daß Aussagen über den Zustand von Zellen *in vivo* getroffen werden können, da quasi das Gewebe nach Entnahme fixiert und anschließend gefärbt wird.

Als Färbemethode diente die direkte und indirekte Immunfluoreszenz. Dabei kamen dieselben Antikörper wie bei der FACS-Analyse zur Anwendung. Es wurden auch bei den Epidermal Sheets Doppelfluoreszenz-Färbungen verwendet. Das Prinzip ist das gleiche wie bei der FACS-Analyse: Eine spezifische Gewebepopulation wird mit einem selektiven Marker charakterisiert und das eigentliche Antigen mit einer Sekundärfluoreszenz gefärbt.

Durchführung:

Zunächst wurde eine 0,5 M NH_4SCN -Lösung vorbereitet, indem 0,38 g NH_4SCN in 10 ml Na-KHPO_4 -Puffer gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt wurde. Der Na-KHPO_4 -Puffer wurde aus 0,1 M Na_2HPO_4 (13,4 g), 0,1 M K_2HPO_4 (6,8 g) und 500 ml Aqua dest. hergestellt. Die Ober- und Unterseite der Mäuseohren wurde mit Pinzetten gesplittet, wobei auf der unteren Ohrhälfte noch die Knorpelreste entfernt werden mußten. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in der NH_4SCN -Lösung bei 37°C . Nun wurde vorsichtig mit Pinzetten die Epidermis abgezogen und dann für 45 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20°C fixiert. Zwecks vollständiger Entfernung des Acetons war es notwendig, die Epidermis zwei- bis dreimal in 1 x PBS zu waschen.

Die Sheets wurden nun in 24-well-Platten mit dem Primärantikörper für mindestens 90 Minuten bei 37°C oder alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie erneut zwei- bis dreimal mit 1 x PBS gewaschen, bis sie schließlich mit dem Sekundärantikörper oder dem FITC-gekoppelten-Detektionsantikörper gefärbt wurden. Das Volumen der zum Färben verwendeten Primär- bzw. Sekundär-Antikörper betrug stets 400 μl pro well. Nach erneuter zwei- bis dreimaliger Waschung mit 1 x PBS wurden die Sheets vorsichtig mit den Haaren nach unten auf einen Objektträger gebracht. Dabei mußten sie möglichst straff und in eine Ebene gebracht werden. Das überschüssige PBS wurde abgesaugt und 2 Tropfen Eindeckelmedium, das aus dem Fluoreszenzverlängerer DABCO (0,25%) in Histogel bestand, aufgetragen.

Nach Aufbringen eines Deckgläschens wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und im Dunkeln gelagert.

2.1.20 Fluoreszenzfärbung von Präparaten mit dem Tyramide Signal Amplification Kit (TSA)

Die Präparate, hier Epidermal Sheets, wurden gemäß 2.1.19 hergestellt und mit dem Primär- bzw. Sekundärantikörper gefärbt, wobei der letzte Antikörper biotinyliert sein mußte. Anschließend wurden die Sheets für 5 Minuten in TNT-Puffer gewaschen und dann in einer 24-well-Platte die unspezifischen Bindungsstellen mit TNB-Puffer abgeblockt. Nach 30 Minuten wurden die Sheets auf Objektträger überführt. In einer feuchten Kammer erfolgte die Zugabe von 100 μl Streptavidin-Peroxidase (1:500 in TNB-Puffer verdünnt). Nach weiteren 30 Minuten erfolgte eine erneute Waschung der Präparate in TNT-Puffer. Im Anschluß daran wurden sie für 4-5 Minuten in der feuchten Kammer mit 300 μl Tyramide-DTAF (1:50 verdünnt in 1x Puffer) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Sheets in TNT-Puffer konnten die Präparate mit Eindeckelmedium, das aus dem Fluoreszenzverlängerer DABCO und Histogel bestand, eingedeckelt werden.

Die Signalverstärkung beruhte auf folgendem Prinzip: Die Peroxidase wurde an den biotinylierten Antikörper gebunden, da sie an Streptavidin gekoppelt war. Das Enzym katalysierte dann die Aktivierung von Tyramide-DTAF zu einem freien Radikal, das aus der kovalenten Bindung an Tyrosin- und Tryptophan-Reste des biotinylierten Antikörpers resultierte. Schließlich konnte dann das an Tyramide gekoppelte DTAF im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

2.1.21 Primäre allogene MELR (Mixed epidermal lymphocyte reaction) mit naiven T-Zellen

Effizient aktivierte T-Zellen produzieren Lymphokine und proliferieren. Daher läßt sich der Grad der Aktivierung von Lymphozyten anhand der Zytokinproduktion und Proliferation feststellen.

Der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen dient hierbei als das Maß für die Proliferation. Da bei der Aktivierung von den T-Zellen Interleukine in das Kulturmedium abgegeben werden, kann in einem indirekten Proliferationsnachweis der Gehalt der Interleukine bestimmt werden. Hierzu können Interleukin-abhängig wachsende Indikatorzelllinien benutzt werden.

Bei einer allogenen MELR werden T-Zellen durch allogene MHC II-Moleküle aktiviert. Aus diesem Grund wurden im Proliferationstest T-Zellen von BALB/c-Mäusen mit APC von Mäusen mit BL/6 Hintergrund oder T-Zellen von BL/6-Mäusen mit APC von Mäusen mit BALB/c-Hintergrund kokultiviert.

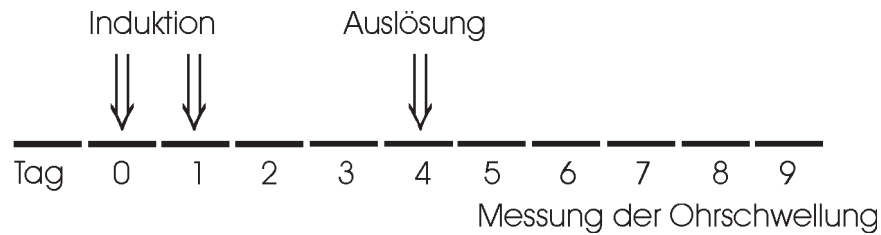
In 96-well-Platten wurden T-Zellen, die zuvor über Nylonwoll-Säulen gereinigt worden waren und die bestrahlten APC, in diesem Fall epidermale Zellsuspensionen oder Milzzellsuspensionen, in 200 µl Kulturmedium kokultiviert. Zwecks Kontrolle wurden dann T-Zellen bzw. APC ohne weitere Zellen sowie T-Zellen mit PHA (5µg/ml) und LPS (1 µg/ml) ausgesät. Die Anreicherung der T-Zellen aus der Milzzellsuspension wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt, indem sie mit direkt FITC-markierten anti-Thy-1-Antikörpern gefärbt wurden. Insgesamt kamen 4×10^5 T-Zellen pro well zum Einsatz.

Innerhalb eines Zeitraums von 4-5 Tagen erfolgte die Kultivierung der Zellen. Nach 3-4 Tagen wurden die Kulturen mit einem Tropfen ^3H -Thymidin-Lösung versetzt (1:50 vorverdünnt, 5,6 kBq oder 0,15 µCi/well) und für weitere 18-20 Stunden inkubiert, damit radioaktives Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut werden konnte. Anschließend wurden die Platten eingefroren, um die Zellen zu lysieren. Nach dem Auftauen der Platten wurde das Lysat mittels "Cell-Harvester" auf eine Glasfiltermembran gesaugt, wobei radioaktive DNA festgehalten wurde. Danach wurde die DNA auf den Glasfaserfiltern für 3 Minuten in der Mikrowelle angebacken. Die Filter wurden mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit in Folie eingeschweißt und im Beta-Plate-Counter gemessen. Die vom Counter berechneten Cpm und Mittelwerte aus Parallelansätzen waren ein direktes Maß für die Proliferation der T-Zellen und damit auch ein Maß für die Intensität der Aktivierung der T-Zellen durch die APC.

2.1.22 Mest (Mouse ear swelling test)

Für diesen Test kam eine veränderte Form des klassischen Mests, wie er erstmals von Asherson und Ptak (189) durchgeführt wurde, zur Anwendung.

Die Allergene DNFB sowie Oxazolone wurden vor der Verwendung in einem Gemisch aus Aceton und Olivenöl (4:1) gelöst. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Kontaktallergene verwendet, deren genauere Beschreibung aus den Abbildungen zu ersehen ist. Sofern nicht anders angegeben, kann der Zeitplan des Ohrschwellungstests der folgenden Grafik entnommen werden.



Die Maus wurde ventral auf einem ca. 4-5 cm² großen Fleck rasiert. Danach wurden 25 µl des DNFB-Gemischs oder eine entsprechende Menge eines anderen Kontaktallergens an den Tagen 0 und 1 auf die betreffende Stelle gegeben, um die Maus zu sensibilisieren. Am Tag 4, dem "Challenge" oder der Auslösung der kontaktallergischen Reaktion, erfolgte dann die Gabe von 10 µl des DNFB-Gemischs oder eine entsprechende Menge eines anderen Kontaktallergens auf jeweils beide Ohrhälften des rechten Ohres der Tiere, auf das linke Ohr als Kontrolle dagegen die äquivalente Menge des verwendeten Lösungsgemischs z.B. Aceton/Olivenöl-Gemisches (4:1) bei einer DNFB-Sensibilisierung. Die Schwellung eines jeden Ohres wurde vor der Auslösung mit einem Mikrometer gemessen. Die Messungen wurden nach der Auslösung alle 24 h und mindestens dreimal von derselben Person durchgeführt. Die genaue Angabe der verwendeten Mengen des Kontaktallergens sind bei der jeweiligen Abbildung speziell angegeben.

2.1.23 Migrationsanalyse von epidermalen Langerhans-Zellen

Für diesen Test kam ein verändertes Protokoll von S. Macatonia und S. Knight (95) zur Anwendung. Die Mäuse wurden entweder mit vorheriger Sensibilisierung auf dem Abdomen oder ohne Sensibilisierung direkt mit einer FITC-Lösung auf den Ohren behandelt. Zu diesem Zweck wurden den Mäusen 25 µl einer vor jedem Versuchstag frisch angesetzten FITC-Lösung aufgetragen. Zur Herstellung der FITC-Lösung wurde 0,2 mg FITC, das in Aceton/Dibutylphthalsäure (1:1) gelöst wurde, angesetzt. Nach 24 h oder 48 h wurden die cervicalen Lymphknoten der Tiere entnommen und gem. 2.1.8 die Zellen vereinzelt. Die Zellen wurden dann mit MEM + 2%FCS gewaschen und mit entsprechenden Antikörpern gefärbt, um sie im FACS analysieren zu können. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC konnte in FL1 nachgewiesen werden, die weiteren Färbungen entweder im FL2 oder FL3. Bei einigen Versuchen wurden die Lymphknotenzellen über einen 14,5%igen Metrizamid-Gradienten angereichert. Dazu wurden 5 ml der Zellsuspension (5×10^6 Zellen/ml) auf 3 ml einer 14,5%igen Metrizamid-Lösung geschichtet. Nach der anschließenden 12-minütigen Zentrifugation der Zellen bei 600 g bei RT wurde die entstandene Interphase vorsichtig abgesaugt und gewaschen. Schließlich wurden die so angereicherten Zellen für die FACS-Analyse mit entsprechenden Antikörpern gefärbt.

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Nucleinsäuren können als geladene Makromoleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer Agarose-Gel-Matrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. DNA ist aufgrund ihres Phosphatrests negativ geladen und wandert daher zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von folgenden Parametern:

Molekulargewicht der DNA (prop. zum Kehrwert des log MW)

Matrixdichte des Gels (Agaroseanteil)

Stärke des angelegten elektrischen Feldes

Konformation der DNA

Durchführung:

In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,4 g Agarose abgewogen und mit 100 ml 1 x TBE-Puffer aufgefüllt. Die 1,4%ige Agarosesuspension wurde dann in der Mikrowelle aufgeköcht. In der Zwischenzeit konnte die horizontale Gelkammer vorbereitet werden. Zunächst wurde der Sockel des Gels mit heißer Agarose gegossen. Nach dessen Abkühlung wurde zügig das Gel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach dem Erkalten der Agarose konnte der Kamm vorsichtig gezogen, die beiden Kammern mit 1 x TBE aufgefüllt und danach durch Einsetzen der Elektroden ein Probelauf des Gels bei 25 mA, 150 V und 5 W gestartet werden.

Im Anschluß daran wurden 1/10-1/5 des Volumens der DNA-Proben mit Bromphenolblau versetzt und in die Kammern aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl ΦX174-RT, die mit *Hae III* geschnitten worden waren, in die Mitte des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte dann mit 25 mA und wurde ca. 2 cm, bevor die Proben das Gel verließen, abgeschaltet. Nachdem die Gelkammer auseinandergelassen, das Gel für 5-10 Minuten in eine 1%ige Ethidiumbromid-Lösung eingelegt und danach kurz unter fließendem Wasser gewaschen wurde, konnte es unter einer UV-Lampe betrachtet werden. Mit Hilfe des Imaging Systems (H.E.R.O.) war eine Auswertung der Banden möglich. Eine entsprechende Abbildung konnte zur Auswertung ausgedruckt werden.

2.2.2 mRNA-Isolierung

Zur Isolierung und Reinigung von mRNA wurde der "Quick Prep mikro mRNA Purification Kit" (Cat-No. 27-9255-01) von Pharmacia verwendet.

Um endogene RNasen schnell zu inaktivieren, erfolgte zunächst die Extraktion der Zellen in einer gepufferten Lösung aus hochkonzentriertem GTC (Guanidin Thiocyanat). Der Extrakt wurde dann dreifach mit dem Elutionspuffer verdünnt, um die GTC-Konzentration zu verringern.

Die Salzkonzentration ermöglichte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Poly-A-Schwänzen der mRNA-Moleküle und der Oligo-dT-Cellulose.

Außerdem verursachte sie eine Proteinpräzipitation.

Nach kurzer Zentrifugation des Extrakts wurde der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Oligo-dT-Cellulose transferiert. Einige Minuten, nachdem sich die Poly-A-RNA an die Oligo-dT-Cellulose angelagert hatte, konnte kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Das pelletierte Material wurde anschließend mehrmals mit High-Salt-Buffer und Low-Salt-Buffer gewaschen und in ein Microspin-Gefäß gebracht. Die Microspin-Säule wurde in ein Microzentrifugen-Gefäß gestellt und dreimal mit Low-Salt-

Buffer gewaschen. Aufgrund der relaxierteren Salzbedingungen konnten andere nucleotidhaltige Moleküle abgewaschen und somit die mRNA gereinigt werden. Schließlich wurde das polyadenylierte Material mit 65 °C warmem Elutionspuffer von der Oligo-dT-Cellulose eluiert. Aufgrund der veränderten Salzbedingungen und der erhöhten Temperatur konnten sodann die Wasserstoffbrückenbindungen der mRNA mit der Oligo-dT-Cellulose aufgelöst werden. Nunmehr war es möglich, die mRNA aus dem Efflux zu fällen.

Durchführung:

Ca. 20 Minuten vor der Präparation wurde der obengenannte Kit auf Raumtemperatur gebracht und der Extraktionspuffer auf 37°C erwärmt, bis sich alle Kristalle gelöst hatten. Dann wurde vorsichtig die Oligo-dT-Cellulose mit Pipetten gemischt und 1 ml davon in Eppendorfhütchen abgefüllt. Zu diesem Zweck wurden für die Extraktion ca. 10^6 - 10^7 Zellen bei 1200 Upm 10 Minuten lang zentrifugiert, bis das Zellpellet in 400 µl Extraktionspuffer aufgenommen werden konnte.

Nach der Lyse der Zellen wurden 800 µl Elutionspuffer hinzupipettiert, durchgemischt und bei 14000 Upm zentrifugiert. Inzwischen konnte die aliquotierte Cellulose zentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Der Zellüberstand wurde dann auf die pelletierte Cellulose gegeben, und die Eppendorfreaktionsgefäße wurden vorsichtig für 3-4 Minuten invertiert. Nach kurzer Zentrifugation konnte der Überstand verworfen werden. Danach wurde das Pellet in 1 ml High-Salt-Buffer aufgenommen, durchgemischt, zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Insgesamt wurde das Pellet 5 x mit High-Salt-Buffer und 2 x mit Low-Salt-Buffer gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in 300 µl Low-Salt-Buffer aufgenommen und auf Mikrospins gegeben. Nach kurzem Anzentrifugieren konnte der Efflux verworfen und 3 x mit 500 µl Low-Salt-Buffer gewaschen werden. Zuletzt wurden die Mikrospins in Schraubdeckel-Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und 200 µl des auf 65°C erwärmten Elutionspuffers hinzupipettiert. Nach erneutem Durchmischen und Anzentrifugieren wurden die Mikrospins nochmals mit 200 µl Elutionspuffer gespült, und der Efflux konnte vereinigt werden.

Durch Zugabe von 40 µl Kaliumacetat, 10 µl Glycogen und 1 ml Ethanol abs. wurde die mRNA nun bei -20°C für mindestens 2 h gefällt. Nach anschließender 20-minütiger Zentrifugation konnte die mRNA in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 4 µl DEPC-Wasser aufgenommen werden.

2.2.3 Reverse Transkription

Für die Generierung der cDNA wurde ein "Gene Amp RNA PCR-Kit" (Cat-No. N808-0017) von Perkin-Elmer (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey) verwendet.

Hierzu war folgender Ansatz erforderlich:

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden 1-3 µl der mRNA mit 0-2 µl DEPC-Wasser versetzt und mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet. Dann wurde der mRNA-Ansatz für 3 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit konnte der Reaktionsansatz (Mengenangaben pro Probe) pipettiert werden:

4 µl MgCl ₂	
2 µl 10 x PCR -Puffer	
2 µl dCTP	
2 µl dATP	
2 µl dGTP	
2 µl dTTP	
1 µl RNase Inhibitor	
1 µl Reverse Transkriptase	
1 µl Hexamerprimer	
<hr/>	
17 µl Volumen	

Die Konzentrationen der Nucleotide, Puffer und Enzyme sind im Materialteil angegeben. Es wurden 17 µl des Reaktionsansatzes zu den 3 µl des mRNA-Ansatzes gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Die reverse Transkription erfolgte für 15 Minuten bei 42°C im Thermocycler. Schließlich wurden die Proben für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

Das *in vitro*-Verfahren dient zur selektiven Anreicherung von Nucleinsäuren definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nucleinsäuremolekülen. Dazu macht man sich die Eigenschaften von DNA-Polymerasen zunutze, die Einzelstränge zu Doppelsträngen aufpolymerisieren können, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

Dieses Verfahren fußt auf folgendem Prinzip:

Eine Nucleinsäure, die die zu amplifizierende Sequenz enthält, reagiert mit einem Überschuß an zwei chemisch synthetisierten Oligonucleotiden. Diese stammen aus Randgebieten der zu amplifizierenden Sequenz und sind strangspezifisch, d.h. sie sind komplementär zu jeweils einem der beiden Stränge. Unter geeigneten Bedingungen bilden sich Hybridmoleküle zwischen jeweils einem cDNA-Strang und dem dazu passenden Oligonucleotid aus. Die Reassoziations von Einzelsträngen zu DNA-DNA-Doppelsträngen hängt im wesentlichen von folgenden Parametern ab:

- DNA-Konzentration: Die Häufigkeit bestimmt, ob sich zwei zueinander passende Moleküle treffen.
- Länge der einzelsträngigen Moleküle: Sie bestimmt einerseits die Anzahl der Nucleationspunkte, andererseits jedoch stellt sie zugleich eine sterische Behinderung dar, die die Reassoziationsgeschwindigkeit negativ beeinflussen kann.
- Reaktionstemperatur: Sie liegt etwa 25°C unter der Schmelztemperatur der Doppelstränge.
- Kationenkonzentration: Sie kann die intramolekulare Abstoßung der negativ geladenen Einzelstränge verringern.
- GC-Gehalt: Er bestimmt die Stabilität der gebildeten Doppelstränge.
- Grad der Basenfehlpaarungen: Er kann die Stabilität der Doppelstränge negativ beeinflussen.

Es können so Einzelstränge, die nur im Bereich der gebundenen Oligonucleotide doppelsträngig sind, erhalten werden. Der doppelsträngige Bereich dient als Primer für die DNA-Polymerase, mit deren Hilfe nun der fehlende Einzelstrang synthetisiert wird.

Die neu synthetisierten Doppelstränge werden nach der Polymerase-Reaktion durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt. Diese liefern wieder einzelsträngige Matrizen, die mit den Oligonucleotiden Doppelstränge ausbilden und erneut als Matrizen für die Synthese weiterer doppelsträngiger Moleküle dienen können. Bei der Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Annealing der Primer und Auffüllreaktion kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen selektiven Anreicherung der von den Oligonucleotiden flankierten Sequenz. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches sind die amplifizierten Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten Bereiche zu erkennen. Für die Reaktion kommt eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zum Einsatz. Die Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von über 70°C und ist für kurze Zeit auch bei 95°C stabil. Es ist also möglich, im gleichen Reaktionsansatz die aufzupolymerisierenden DNA-Einzelstränge durch Hitze zu denaturieren, ohne daß das Enzym zerstört wird und nicht nach jedem Denaturieren erneut hinzugefügt werden muß.

Die Vorteile der PCR gegenüber anderen Verfahren der Genisolierung, z.B. der Anlage von Genbanken, liegen in der raschen Durchführbarkeit der Technik. Außerdem ist die Tatsache, daß von kleinsten Mengen genomischer DNA oder über die reverse Transkription von mRNA ausgegangen werden kann, von zentraler Bedeutung. Es genügen ca. 10^6 Zellen, um eine Menge von 500 ng DNA oder cDNA zu gewinnen, die für eine PCR ausreichend ist. In den meisten Fällen, in denen es darum geht, eine bestimmte DNA-Sequenz im Genom oder eine bestimmte mRNA im Cytosol nachzuweisen, macht die PCR den Einsatz aufwendiger Methoden wie z.B. Southern- oder Northern-Blots überflüssig. Um beispielsweise die Bildung von Interleukinen durch Zellen zu überprüfen, wird mRNA isoliert und über reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern kann nun die Präsenz von mRNA nachgewiesen werden.

Durchführung:

Für die PCR wurde ein Kit von Perkin-Elmer verwendet. (Siehe Methodenteil 2.2.3; Reverse Transkription)

Aus dem reversen Transkriptions-Ansatz mit einem Volumen von 20 µl wurden für die PCR jeweils 1-20 µl entnommen. Ergo ergab sich folgender PCR-Mix-Ansatz für 1 µl RT-Ansatz:

8 µl MgCl ₂	
10 µl 10 x PCR-Puffer	
2 µl dCTP	
2 µl dATP	
2 µl dGTP	
2 µl dTTP	
1 µl Primer 1	
1 µl Primer 2	
70 µl DEPC-Wasser	
1 µl Taq-Polymerase	
<hr/>	
99 µl Volumen	

Die Konzentrationsangaben der Nucleotide und der Puffer sind dem Materialteil 1.4.2 zu entnehmen.

Pro Probe wurden nun 99 µl des PCR-Mix-Ansatzes zu 1 µl der cDNA gegeben, gemischt und mit 3 Tropfen Öl überschichtet. Die AmpliTaq-Polymerase wurde während des Starts des Thermocyclers zugegeben (Hot Start), während die AmpliTaq-Polymerase™ Gold erst vor dem Programmablauf durch einen Vorzyklus bei 94°C für 11 Minuten aktiviert werden mußte.

Um unspezifische Bandenmuster zu verhindern, wurde die PCR bei verschiedenen primerspezifischen Annealing-Temperaturen und Zyklenzahlen durchgeführt. Außerdem kamen verschiedene Vorzyklen zum Einsatz.

Die Denaturierung erfolgte aber immer bei 94°C.

Die Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase lag bei 72°C.

Bei einigen Ansätzen wurde die Reaktionszeit um 2 sec pro Cyclus verlängert.

Die genauen Reaktionsbedingungen sind bei jeder Abbildung spezifisch angegeben.

Zur Testung der PCR-Produkte wurde zunächst ein 1,4%iges Agarosegel gegossen. Dann wurden 20 µl aus dem PCR-Ansatz mit 7 µl Bromphenolblau gemischt und aufgetragen. Als Marker dienten 5 µl ΦX-174-RF/Hae III. Die Gelelektrophorese wurde mit 15 mA gestartet. Anschließend wurde das Gel 5 Minuten lang in 1%iger Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Imaging-System.

2.2.5 Primer

2.2.5.1 Auswahl der Primersequenz

Die Auswahl der Primersequenz erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Die Primer sollten eine Länge von ca. 18-25 Nukleotiden aufweisen, um ein effizientes Anbinden an die Zielsequenz zu gewährleisten.
- Der Abstand zwischen dem 5'- und dem 3'-Primer sollte so groß sein, damit das PCR-Produkt eine Größe von 200-600 bp erreichen kann.
- Jeder Primer eines Primerpaars darf an seinem 3'-Ende keine komplementäre Sequenz von mehr als drei Basen zum jeweils anderen Primer aufweisen, um das gegenseitige Anbinden der zwei Primer und damit die Entstehung von Primer-Dimeren zu verhindern.
- Der GC-Gehalt sollte mehr als 50% betragen, und alle Basen sollten möglichst gleichmäßig verteilt sein. Insbesondere ist zu vermeiden, daß eine Wiederholung von mehr als 3 Pyrimidinen vorliegt.
- Die Primer sollten keine internen symmetrischen Sequenzen besitzen, um die Bildung von internen Schleifen auszuschließen. Die Bildung solcher Schleifen verringert die Effizienz der Amplifikation.
- Die Schmelzpunkte der 5'- und 3'-Primer sollten möglichst gleich sein, bzw. die Abweichung sollte nicht mehr als 2°C betragen.
- Wenn die Struktur des Gens bekannt ist, sollten der 5'- und 3'-Primer jeweils in unterschiedlichen Exons liegen, die durch ein oder mehrere Introns getrennt sind.
- Die Bindungsstellen der Primer sollten 500-1000 bp vom Ende des Gens entfernt sein.

Als Grundlage für die Primerwahl fungierte die GenBank-Datenbank bzw. die folgenden Veröffentlichungen. Die genaue Sequenz befindet sich im Anhang.

3-Phosphoglyceratkinase:PGK-1: 5'-CCTGGCTATCTTGGGAGGCG-3'PGK-2: 5'-CCCATCCAGCCAGCAGGTAT-3'**TNFR1:** Goodwin et al. (190)TNFR1I-1: 5'-GTGCTTTCCAAGATGAACCTG-3' (T_m=57,9 °C)TNFR1I-2: 5'-ACTCACAAGTGGCTGGCTCA-3' (T_m=59,4 °C)TNFR1III-1: 5'-CCAAGCTGACAAGGACACGG-3' (T_m=61,4 °C, Dr. Pfeffer)TNFR1III-2: 5'-GCAGTGGCTGCAAGGGACG-3' (T_m=63,1 °C, Dr. Pfeffer)**TNFR2:** Rothe et al. (191)TNFR2I-1: 5'-AGGATGCAGTAGGCCTTGAG-3' (T_m=59,4 °C)TNFR2I-2: 5'-GACGGACACTCCTCCTGAGA-3' (T_m=61,4 °C)TNFR2II-2: 5'-TGCTACAGACGTTACGATGCAGG-3' (T_m=64,4 °C, Dr. Bader)**2.2.5.2 Rekonstruktion der Primer**

Alle Primer wurden lyophilisiert angeliefert. Die Mengenangabe der Primer erfolgte in OD260-Einheiten. Zur Rekonstruktion wurde das Pellet entsprechend der angegebenen Menge in Aqua dest. gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/μl zu erreichen. Die gelösten Primer wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Allgemeine Methoden

Die Color-Positivabzüge wurden als Fremdarbeiten vom Photolabor Oehling, Mainz oder vom Photolabor der Hautklinik angefertigt.

2.3.1 Photographie der Präparate

Die photographische Dokumentation der fluoreszenzgefärbten Präparate erfolgte mit einem Leitz-Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden Dia- oder Negativfilme von Kodak mit einer Lichtempfindlichkeit von 1000 oder 400 ASA verwendet. Die Präparate konnten mit 63x (Oel), 50x (Oel) und 40x Vergrößerung photographiert werden.

Die Photographie der nicht-fluoreszierenden Präparate wurde mit einem Olympus-Mikroskop mit Kameraaufsatz bewerkstelligt.

2.3.2 Scannen der Gele

Die mit dem Imaging-System (HEROLAB) ausgewerteten Gele wurden mit 600 dpi gescannt und als TIFF-Files abgespeichert.

2.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Validierung der Ohrschwellungsreaktionen erfolgte mit dem Student-t-Test. Es kam der unabhängige zweiseitige t-Test zur Anwendung. Er diente zur Prüfung der Frage, ob aus den beobachteten Unterschieden in den Mittelwerten zweier Meßreihen der Schluß

gezogen werden kann, daß auch die beiden Grundgesamtheiten, denen die Stichproben entstammen, sich im Mittelwert unterscheiden oder ob der beobachtete Unterschied rein zufälliger Natur ist. Der t-Test basiert auf einem Vergleich der Mittelwerte zwischen zwei Datenreihen und geht von der Null-Hypothese aus, daß die zwei verglichenen Datenreihen verschieden sind. Die Hypothese wird durch einen Vergleich des berechneten t-Wertes mit einem vorgegebenen Wert verglichen und dementsprechend angenommen oder abgelehnt (192,193).

III. Ergebnisse

Teil1: Bedeutung von TNF bei der Kontaktallergie

TNF- α ist als inflammatorisches Zytokin an einer Reihe von Reaktionen beteiligt wie die Regulation von Adhäsions- und Costimulator-Molekülen, Aktivierung von Neutrophilen, Induktion der Chemokinsekretion und die Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Weiterhin wird TNF- α als ein Stimulus für die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis in die Lymphknoten angesehen. TNF- α bindet an zwei verschiedene Membranrezeptoren, TNFR1 (auch TNFR-p55) und TNFR2 (auch TNFR-p75). Der TNF-Rezeptor 1 scheint der biologisch relevantere Rezeptor zu sein und besitzt eine Reihe von TNF-Aktivitäten, die deutlich von denen des TNFR2 abgegrenzt werden können. Um die Rolle von TNF bei einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV untersuchen zu können, wurden TNFR1- und TNFR2-defiziente Mäuse eingesetzt und ihre Reaktion in bezug auf Kontaktallergene getestet. Außerdem wurde die Bedeutung der TNF-Rezeptoren bei der Migration von Langerhans-Zellen aus TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen im Zuge einer kontaktallergischen Reaktion untersucht. Weiterhin wurde die Expression der TNF-Rezeptoren auf Epidermalzellen sowohl zytofluorometrisch als auch auf molekularer Ebene zu klären versucht.

1 Untersuchungen an TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen

Der erste Abschnitt der Arbeit befaßt sich mit der Rolle von TNF bei der Kontaktallergie. Dazu wurden zuerst Erkenntnisse zur kontaktallergischen Reaktion bei TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen gewonnen. Weiterhin wurde anhand von Epidermal Sheets die Morphologie von epidermalen Langerhans-Zellen der TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen untersucht. Anschließend konnte der Einfluß der TNF-Rezeptoren auf die Stimulationskapazität epidermaler Zellen mit Hilfe TNFR1- bzw. TNFR2-defizienter Mäuse untersucht werden. Schließlich wurde herausgestellt, welche Bedeutung die TNF-Rezeptoren bei der Migration von Langerhans-Zellen aus TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen im Verlauf einer kontaktallergischen Reaktion haben.

1.1 Untersuchungen zur Kontaktallergie bei TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen

Im folgenden wurde bei TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen der Ohrschwellungsverlauf im Falle einer kontaktallergischen Reaktion untersucht. Hierbei kamen als Allergene DNFB und Oxazolon zum Einsatz.

In Abb. 1 ist der Verlauf einer durch DNFB ausgelösten Schwellungsreaktion bei TNFR1-defizienten Mäusen und Kontroll-Mäusen repräsentativ dargestellt. Die Tiere wurden an den Tagen 0 und 1 mit DNFB sensibilisiert, und am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Die Ohrschwellungen der Tiere wurden 24 h nach der Auslösung gemessen und grafisch dargestellt.

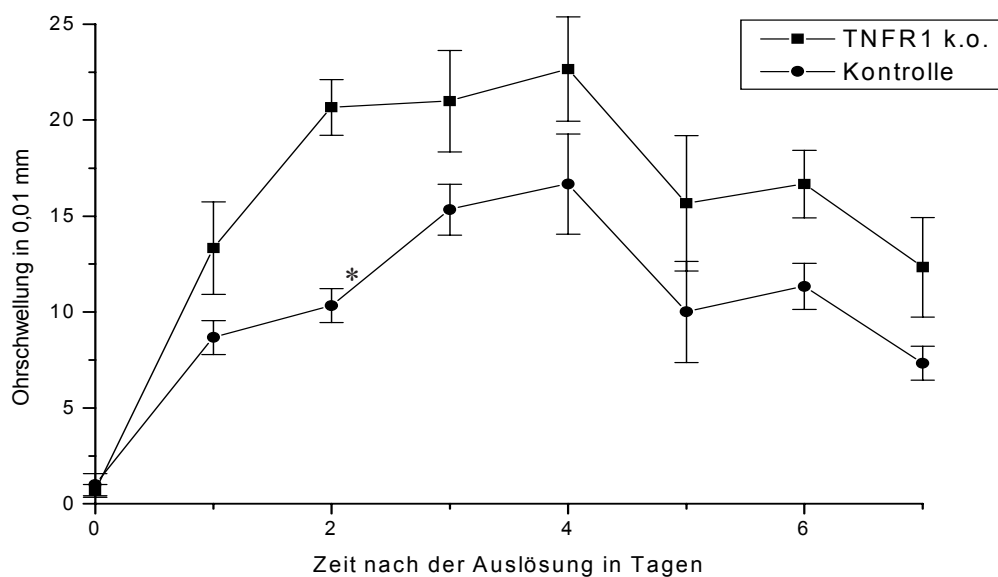


Abb. 1 Verlauf der kontaktallergischen Reaktion bei TNFR1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen

Die an diesem Versuch beteiligten zwei Gruppen von je 3 Mäusen wurden an den Tagen 0 und 1 mit je 17 μ l 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl 4:1) am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie mit 7,5 μ l 0,4% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Nach 24 h wurde mittels eines Mikrometers die Schwellung jedes Ohres gemessen. Danach wurde die Differenz ermittelt und der Mittelwert berechnet. Der mit Stern gekennzeichnete Wert ist signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Werten der jeweils anderen Gruppe. ($p < 0,05$)

Aus der Grafik ist ersichtlich, daß die Schwellungswerte der TNFR1-defizienten Mäuse während des gesamten Verlaufs der Schwellungsreaktion etwas höher waren als die der Kontrollmäuse. Eine statistische Überprüfung der Werte mit dem t-Test ermittelte zumindest für den Tag 2 eine Überreaktivität gegenüber DNFB bei den TNFR1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

In einem weiteren Versuch wurde der Schwellungsverlauf bei TNFR2-defizienten Mäusen in bezug auf das Kontaktallergen DNFB untersucht. Dazu wurden die Tiere wiederum an den Tagen 0 und 1 mit DNFB auf dem Abdomen sensibilisiert, und am Tag 4 erfolgte dann die Auslösung der kontaktallergischen Reaktion auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Die Abb. 2 stellt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments dar.

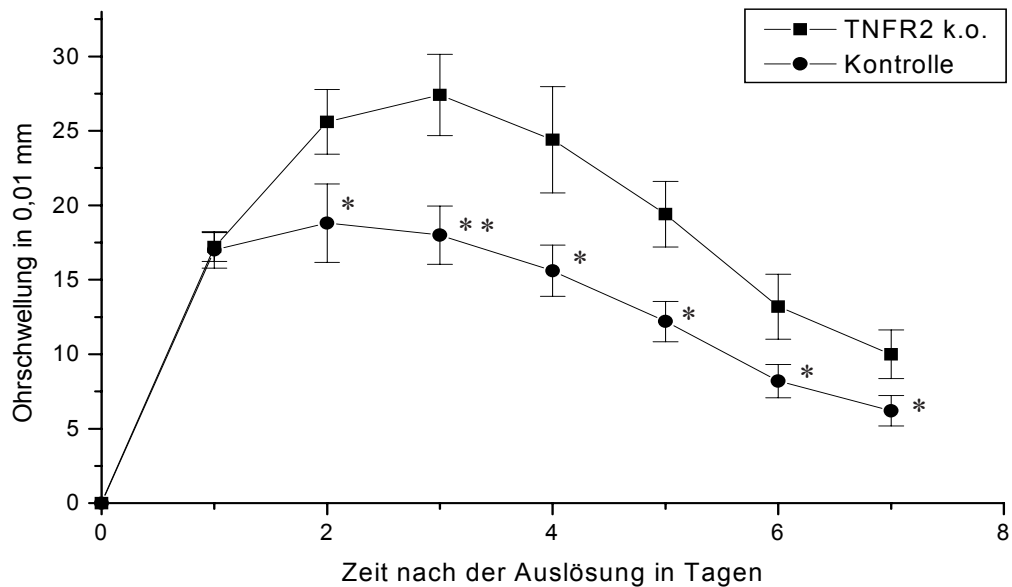


Abb. 2 Verlauf der kontaktallergischen Reaktion bei TNFR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen

Die an diesem Versuch teilnehmenden 2 Gruppen von je 5 Mäusen wurden an den Tagen 0 und 1 mit je 25 μ l 0,5% DNFB (Aceton/Olivenöl 4:1) am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Nach 24 h wurde mittels eines Mikrometers die Schwellung an jedem Ohr gemessen, die Differenz ermittelt und der Mittelwert berechnet. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Werten der anderen Gruppe. (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$)

Die Schwellungswerte der TNFR2-defizienten Mäuse waren gemäß der Verlaufskinetik immer etwas höher als die der Kontrollmäuse. Die statistische Überprüfung der Werte ergab bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,1$ signifikant unterschiedliche Schwellungswerte. Es kann also eine Überreaktivität der TNFR2-defizienten Tiere gegenüber dem Kontaktallergen DNFB festgestellt werden.

In einem erneuten Versuch sollte die kontaktallergische Reaktion der TNFR2-defizienten Mäuse mit dem Kontaktallergen Oxazolone untersucht werden. Dazu wurden die Tiere am Tag 1 am Abdomen sensibilisiert, und am Tag 4 erfolgte auf den jeweils rechten Ohren die Auslösung der kontaktallergischen Reaktion. In Abb. 3 ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

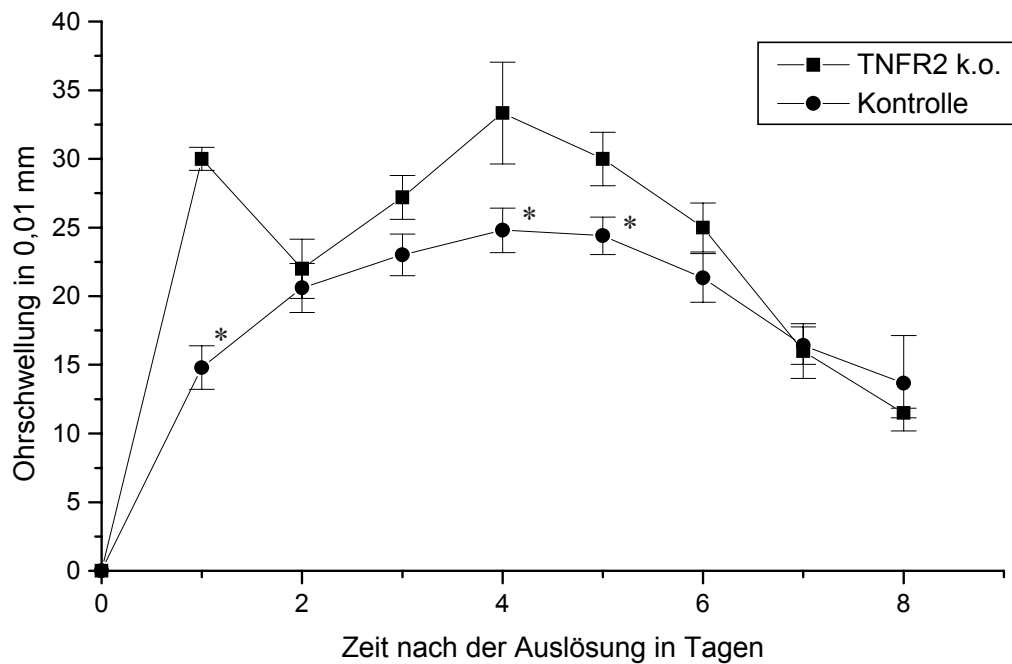


Abb. 3 Verlauf einer Oxazolone-induzierten kontaktallergischen Reaktion bei TNFR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen

Die an diesem Versuch teilnehmenden 2 Gruppen von je 5 Mäusen wurden am Tag 1 mit je 25 μ l 750 μ g/ml Oxazolone am Abdomen sensibilisiert und am Tag 4 mit 10 μ l 30 μ g/ml Oxazolone auf jeder Seite des jeweils rechten Ohres der Tiere behandelt. Nach 24 h wurde mittels eines Mikrometers die Schwellung eines jeden Ohres gemessen, die Differenz ermittelt und der Mittelwert berechnet. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Werten der jeweils anderen Gruppe. ($p < 0,05$)

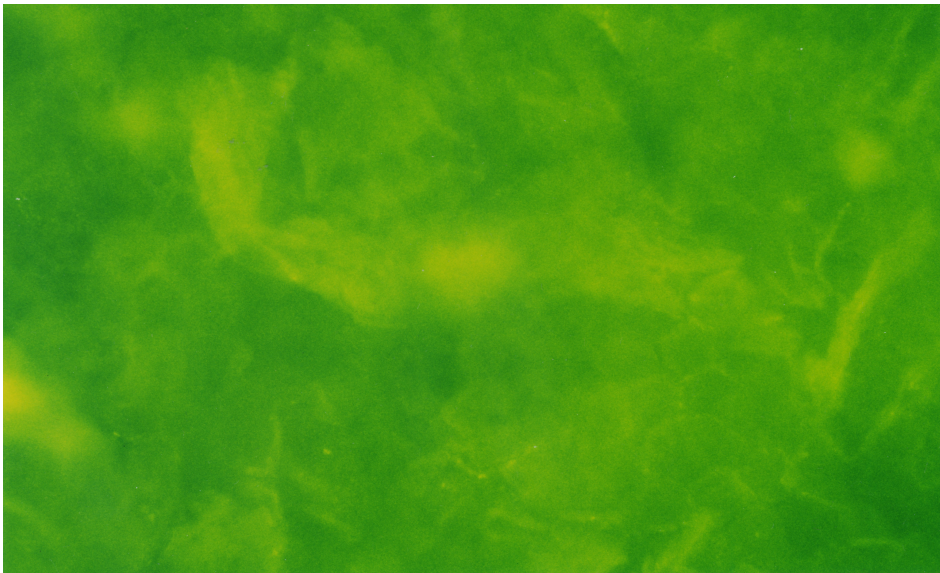
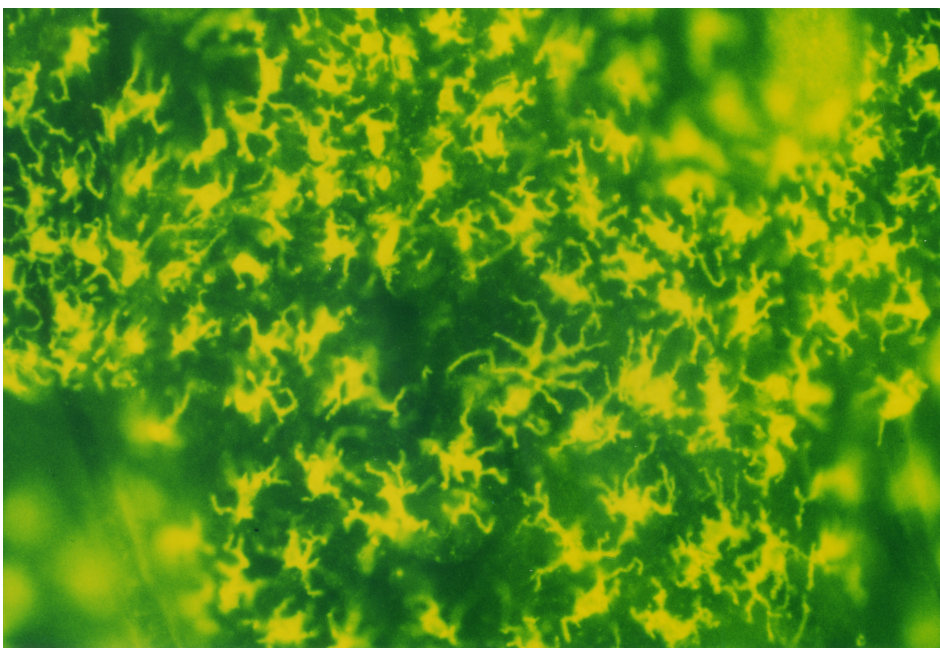
Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Schwellungswerte der TNFR2-defizienten Mäuse etwas höher waren als die der Kontrollmäuse. Mit Hilfe der t-Tests wurden die Schwellungswerte auf ihre Signifikanz hin untersucht. An den Tagen 1, 4 und 5 sind die Schwellungswerte der TNFR2-defizienten Mäuse signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Dies spricht für eine Überreaktivität der TNFR2-defizienten Tiere gegenüber dem Kontaktallergen Oxazolone.

Zusammenfassend kann man eine deutliche Überreaktivität der TNFR2-defizienten Mäuse gegenüber DNFB feststellen. Bezüglich der Reaktion der TNFR2-defizienten Mäuse gegenüber Oxazolone kann man ebenfalls von einer überreaktiven Schwellungsreaktion sprechen. Die TNFR1-defizienten Mäuse zeigten eine von den Werten her erhöhte Schwellungsreaktion gegenüber den Werten der Kontrollmäuse, die jedoch nicht vollständig statistisch abgesichert ist.

1.2 Histologische Charakterisierung epidermaler Langerhans-Zellen aus TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen

Um die Frage klären zu können, ob epidermale Langerhans-Zellen von TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen möglicherweise morphologischen Veränderungen unterworfen sind, wurden Epidermis-Präparate (Epidermal Sheets) von TNFR1-, TNFR2- und Kontrollmäusen hergestellt. Bei der Präparation wurde, wie im Methodenteil 2.1.19 angegeben, vorgegangen.

Die Färbung der Präparate erfolgte mit anti-MHC II-Antikörpern. Wie aus den Abb. 4 A, B, C, D zu ersehen ist, besitzen TNF-Rezeptor-defiziente Mäuse Langerhans-Zellen, was an der deutlich ausgeprägten dendritischen Struktur der Zellen zu erkennen ist. Die Langerhans-Zellen aller drei Gruppen bilden ein Langerhans-Zell-Netz, das durch unspezifisch angefärbte Haarschäfte durchbrochen ist. Die Langerhans-Zellen der TNF-Rezeptor-defizienten Mäuse scheinen in bezug auf die Expression von MHC II keine Differenzen zu den Langerhans-Zellen der Kontrollmäuse aufzuweisen. Demnach spielt der fehlende TNF-Rezeptor 1 bzw. 2 bei der Differenzierung der Zellen und der Ausbildung der morphologischen Struktur keine Rolle.

**Abb. 4 A****Abb. 4 B**

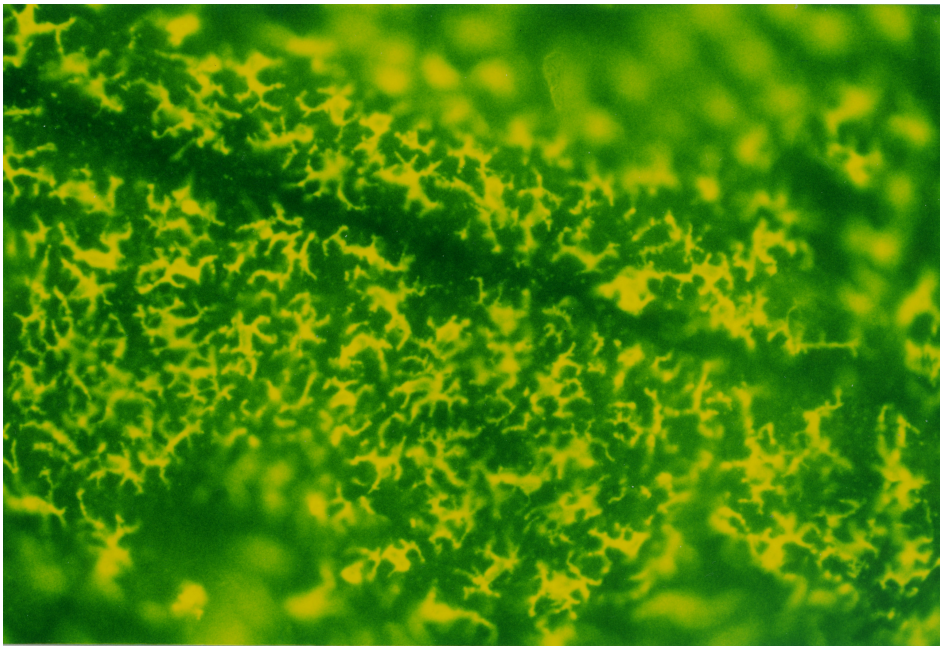
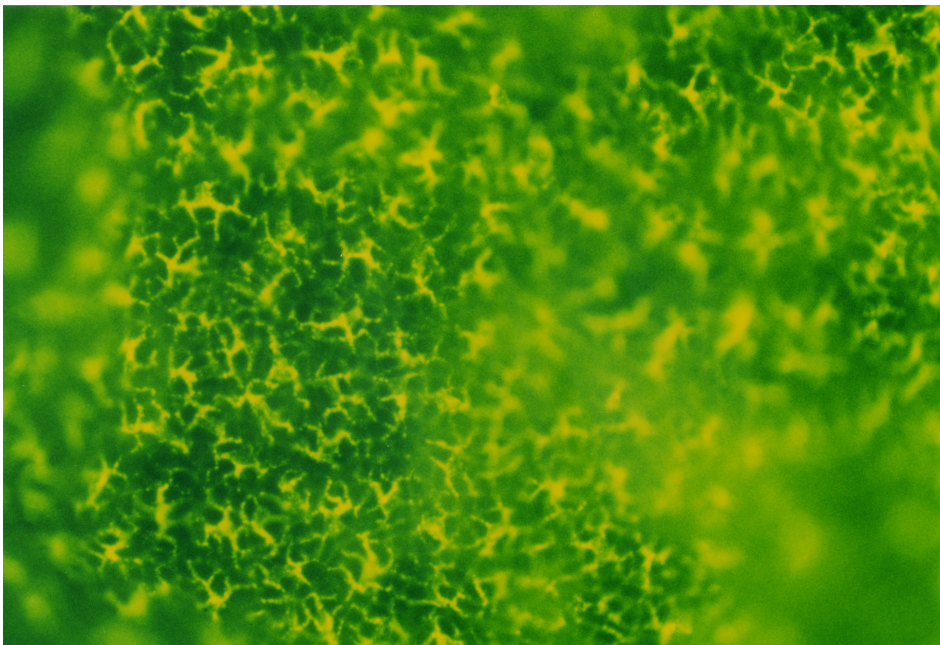
**Abb. 4 C****Abb. 4 D**

Abb. 4 Epidermal Sheets von TNF-Rezeptor 1- bzw. TNF-Rezeptor 2-defizienten Mäusen sowie Kontrollmäusen, die mit Anti-MHC II-Antikörpern gefärbt wurden

Die Präparate wurden, wie im Methodenteil 2.1.19 beschrieben, hergestellt. Die Färbung der MHC II-positiven Zellen erfolgte durch Zugabe von Kulturüberstand des Hybridoms 2G9. Die Primärantikörper wurden mit Maus-anti-Ratte IgG^{DTAF}-Antikörpern nachgewiesen und die Präparate bei einer Vergrößerung von 200x fotografiert.

In Abb. 4 A ist die Färbung des Isotyps Ratte IgG2a bei TNFR2-defizienten Mäusen repräsentativ dargestellt. Abb. 4 B zeigt die MHC II-Färbung bei TNFR1-defizienten Mäusen. Abb. 4 C zeigt die MHC II-Färbung bei TNFR2-defizienten Mäusen. Schließlich ist in Abb. 4 D die MHC II-Färbung bei den Kontroll-Mäusen dargestellt.

1.3 Stimulationskapazität epidermaler Zellen von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen für T-Zellen

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit Untersuchungen der TNFR1- und TNFR2-defizienten Langerhans-Zellen bezüglich ihrer T-Zell-Stimulationsfähigkeit.

Um feststellen zu können, ob die T-Zell-Aktivierungspotenz der epidermalen Langerhans-Zellen aus TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen durch das Fehlen des TNFR1- und TNFR2-Gens in irgendeiner Weise beeinträchtigt war, wurden Proliferationstests, sogenannte allogene MELR (mixed epidermal lymphocyte reaction) mit frisch isolierten und 3-Tage-kultivierten epidermalen Zellsuspensionen durchgeführt. Da die TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäuse den H-2^b-Typ aufwiesen, wurden allogene naive Milz-T-Zellen des H-2^d-Typs (BALB/c) als "Responder"-Zellen verwendet. Bei jeder MELR wurden die Milz-T-Zellen über Nylonwolle (Methodenteil 2.1.12), die Makrophagen und B-Zellen zurückhält, angereinigt. Die Erythrozyten wurden durch Inkubation mit Gey'scher Lösung lysiert. Die so gewonnenen Zellen wurden in FACS-Analysen mit anti-Thy-1-Antikörpern gefärbt, um den Anreicherungsgrad (45-68%) zu bestimmen.

In Abb. 5 sind die Ergebnisse eines Proliferationstests unter Verwendung von frisch isolierten und 3-Tage-kultivierten epidermalen Zellen von TNFR1-defizienten- und Kontrollmäusen dargestellt. Pro MELR wurde die Milz von ca. 5-6 Tieren vom H-2^d-Typ präpariert. Die BALB/c T-Zellen wurden mit 4×10^5 Zellen pro well eingesetzt, und die Testmarkierung erfolgte nach 72 h mit ³H-Thymidin.

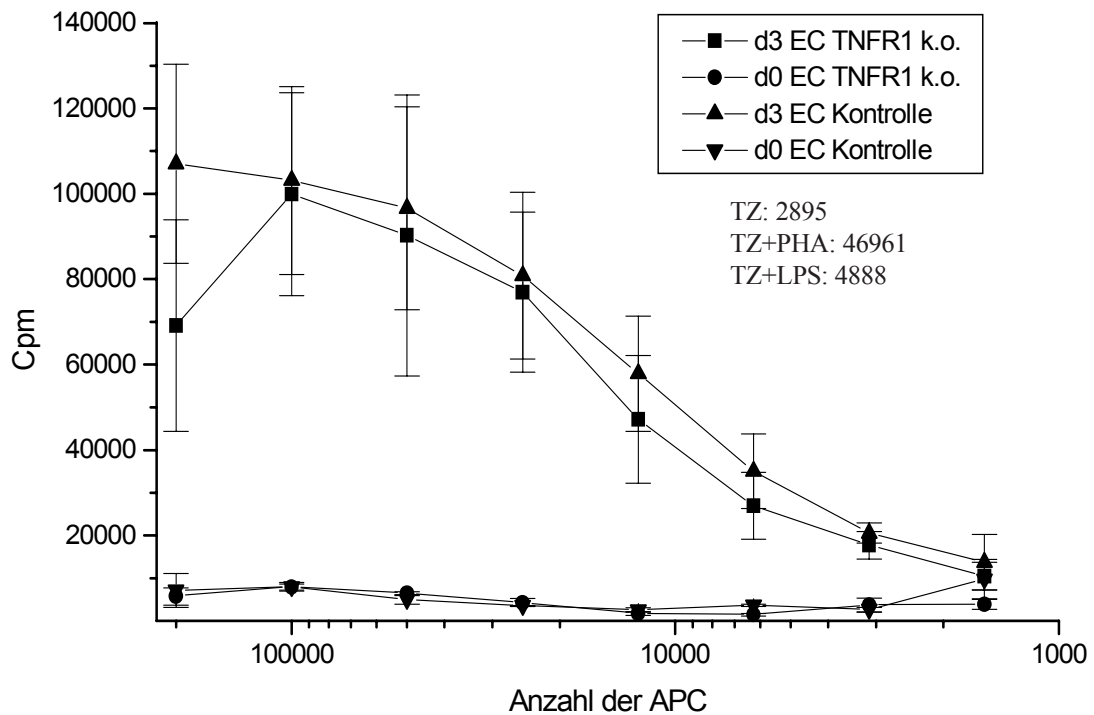


Abb. 5 Allogene MELR mit epidermalen Zellen aus TNFR1-defizienten- und Kontroll-Mäusen

In der Abbildung sind die Ergebnisse des MELR-Tests mit frisch isolierten (d0) und 3-Tage-kultivierten (d3) epidermalen Zellen von TNFR1-defizienten- und Kontroll-Mäusen dargestellt. Als Responder-Zellen wurden über Nylonwolle angereinigte Milz-T-Zellen vom H-2^d-Typ (BALB/c) verwendet. Eine Zählung der Einzelzellsuspension nach der Isolierung und Gey'scher Lyse ergab ca. 4×10^8 Zellen. Nach der Anreicherung in der Nylonwollsäule konnten noch 148×10^6 Zellen gezählt werden. Es kamen 4×10^5 T-Zellen pro well zum Einsatz. Die Zellzahl der epidermalen Zellen wurde, von 2×10^5 ausgehend, 1:2 titriert. Nach 72 h erfolgte die Markierung der Zellen mit 1:50 ³H-Thymidin für einen Zeitraum von 24 h. Zwecks Kontrolle wurden die T-Zellen mit PHA und LPS stimuliert.

Deutlich ist der Unterschied zwischen der Stimulationskapazität der kultivierten und frisch isolierten epidermalen Langerhans-Zellen zu erkennen. Die Letztgenannten beider Mausstämme konnten allogene T-Zellen nur schwach stimulieren, hingegen konnten die kultivierten Langerhans-Zellen die Proliferation naiver, allogener T-Zellen effektiv induzieren. Vergleicht man die Stimulationskapazität der frisch isolierten bzw. kultivierten epidermalen Zellen von TNFR1-defizienten Mäusen mit den Kontroll-Mäusen, so können keine Unterschiede festgestellt werden.

In Abb. 6 sind die Ergebnisse eines Proliferationstests unter Verwendung von frisch isolierten und 3-Tage-kultivierten epidermalen Zellen von TNFR2-defizienten- und Kontrollmäusen dargestellt. Die T-Zellen wurden wiederum mit 4×10^5 Zellen pro well eingesetzt.

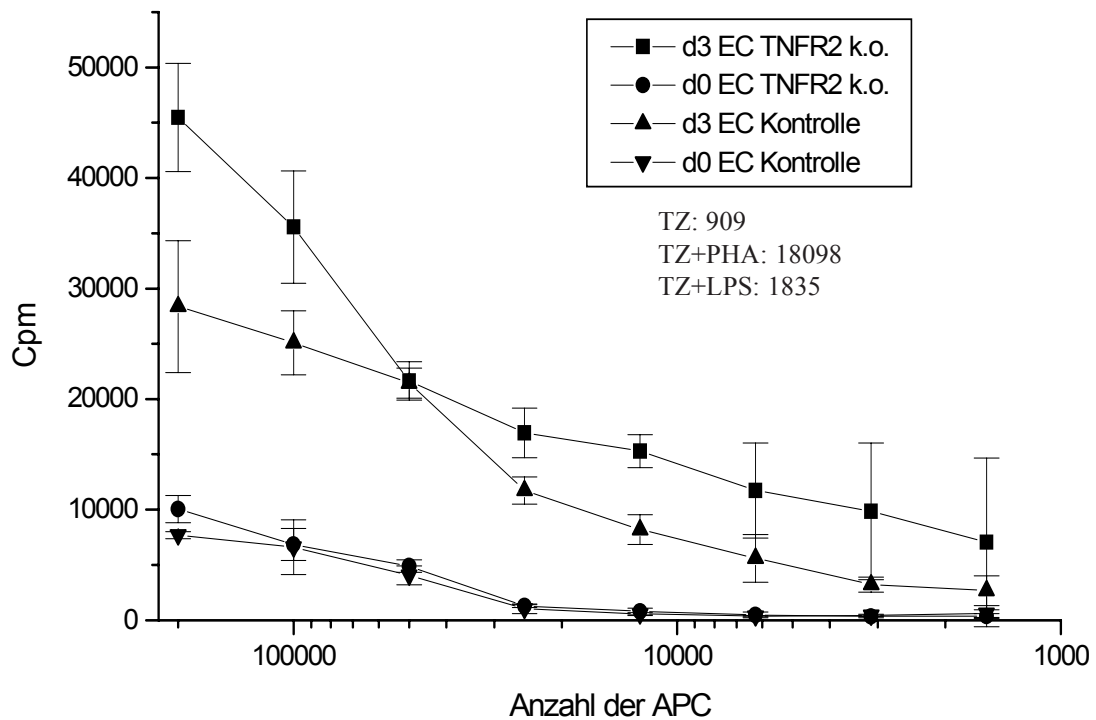


Abb. 6 Alloge MELR mit epidermalen Zellen aus TNFR2-defizienten- und Kontroll-Mäusen

In der Abbildung sind die Ergebnisse des MELR-Tests mit frisch isolierten und 3-Tage-kultivierten epidermalen Zellen von TNFR2-defizienten- und Kontroll-Mäusen dargestellt. Als Responder-Zellen fanden über Nylonwolle angereinigte Milz-T-Zellen von BALB/c-Mäusen Verwendung. Es wurden 4×10^5 T-Zellen pro well eingesetzt. Die Zellzahl der epidermalen Zellen wurde, von 2×10^5 ausgehend, 1:2 titriert. Nach 72 h erfolgte die Markierung der Zellen mit 1:50 ^3H -Thymidin für einen Zeitraum von 24 h. Die T-Zellen wurden zwecks Kontrolle mit PHA und LPS stimuliert.

Auch hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen frischen und kultivierten epidermalen Zellen. Die kultivierten Langerhans-Zellen sind viel bessere Stimulator-Zellen als nicht-kultivierte. Hinsichtlich der Stimulationsfähigkeit von Langerhans-Zellen aus TNFR2-defizienten- und Kontroll-Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied.

Es konnten somit bei den Versuchen zur Stimulationskapazität von epidermalen Zellen aus TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Offenbar scheint sich die Defizienz von TNFR1 bzw. TNFR2 auf die stimulatorische Potenz der Langerhans-Zellen nicht negativ ausgewirkt zu haben.

1.4 Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen

Aus früheren Experimenten, die die Wanderung von Langerhans-Zellen aus der Haut in die Lymphknoten thematisieren, ist bekannt, daß TNF ein entscheidender Stimulus dafür ist. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde die Migration von Langerhans-Zellen bei TNF-Rezeptor 1- und TNF-Rezeptor 2-defizienten Mäusen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs FITC untersucht. FITC ist ein schwaches Kontaktallergen und wird von Langerhans-Zellen in der Haut aufgenommen, prozessiert und nach der Wanderung in die Lymphknoten präsentiert. Die Lymphknotenzellen wurden isoliert und im FACS analysiert. Das aufgenommene FITC ist in Kanal 1 meßbar und gibt einen Hinweis auf die erfolgte Migration der Langerhans-Zellen von der Haut in die Lymphknoten.

Abb. 7 A und B stellen eine repräsentative Migrationsstudie von TNF-Rezeptor 1-defizienten Mäusen dar. Die Versuchstiere wurden 24 h vor Entnahme der cervicalen Lymphknoten mit 1% FITC in Azeton/Dibutylphtalsäure auf beiden Ohren behandelt. Mit Hilfe von anti-MHC II-Antikörpern und entsprechenden Isotyp-Antikörpern konnten die inzwischen vereinzelt Zellen gefärbt werden. An die Primärantikörper erfolgte danach die Koppelung der Ziege-anti-Ratte IgG^{bio}-Antikörper sowie von Streptavidin-QR. Die Zellen wurden anschließend im FACS auf FITC in Kanal 1, und die Expression von MHC II-Molekülen wurde in Kanal 3 untersucht. Mit Hilfe der Isotyp-Färbungen in Abb. 7 A wurden die Quadranten in der Abb. 7 B gesetzt. Die Kontrolltiere wiesen in Abb. 7 A bei der Isotypfärbung 0,3 % FITC-positive und FL3-positive Zellen auf. Einen Wert von 0,3 % konnte man auch bei den TNFR1-defizienten Mäusen beobachten. Nach der Färbung mit anti-MHC II-Antikörpern (Abb. 7 B) erhöhten sich die FITC-positiven sowie MHC II-positiven Zellen bei den Kontrolltieren auf 2,0 %. Bei den TNFR1-defizienten Tieren ergaben sich 1,7 % FITC-positive und MHC II-positive Langerhans-Zellen. 24 h nach der Behandlung der Mäuse mit FITC waren bei den Kontrollmäusen sowie bei den TNFR1-defizienten Mäusen somit Langerhans-Zellen festzustellen, die FITC präsentieren konnten. Annähernd gleiche Zellzahlen konnten bei den Kontrollmäusen und den TNFR1-defizienten Tieren beobachtet werden. Es konnte nach Abzug des prozentualen Anteils der Zellen, die vor der FITC-Behandlung doppelt-positiv waren, bei den Kontrolltieren 1,7 % und bei dem TNFR1-defizienten Tieren 1,4 % FITC- und MHC II-positive Zellen beobachtet werden. Offenbar wirkt sich die Abwesenheit des TNF-Rezeptors 1 nicht auf das Wanderungsverhalten der Langerhans-Zellen aus. Von einer verringerten Anzahl der migrierenden Zellen bei TNFR1-defizienten Mäusen kann nicht gesprochen werden.

Abb. 8 A, B und C stellen eine repräsentative Migrationsanalyse von Langerhans-Zellen bei TNFR2-defizienten Mäusen dar. Dazu wurden die Tiere wiederum 24 h vor Entnahme der cervicalen Lymphknoten mit 1 % FITC in Azeton/Dibutylphtalsäure auf beiden Ohren behandelt. Zur Kontrolle wurden die cervicalen Lymphknoten unbehandelter Mäuse jeder Gruppe verwendet. Nach der Vereinzelung der Zellen wurden diese zunächst mit Hilfe eines 14,5%igen Metrizamid-Gradienten angereinigt und dann mit anti-MHC II-Antikörpern sowie entsprechenden Isotyp-Antikörpern inkubiert. Die Primärantikörper konnten anschließend mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE}-Antikörpern gefärbt werden. FITC-positive Zellen konnten in Kanal 1 und MHC-II positive-Zellen in Kanal 2 des FACS beobachtet werden. Mit Hilfe der Isotyp-Färbungen in Abb. 8 A wurden die Quadranten in den Abb. 8 B und C gesetzt.

Die Kontrolltiere wiesen in Abb. 8 B einen prozentualen Anteil von 1,6 % FITC-positiven und MHC II-positiven Zellen auf. Damit lag ihr Anteil etwas höher als der der 0,9 % FITC-positiven und MHC II-positiven Zellen der TNFR2-defizienten Mäuse. 24 h nach FITC-Behandlung war die Zahl der doppelt-positiven Langerhans-Zellen der Kontrolltiere auf 7,6% angestiegen. Die TNFR2-defizienten Mäuse besaßen zu diesem Zeitpunkt 5,4% FITC-positiv und MHC II-positiv Langerhans-Zellen (Abb. 8 C). Damit konnte nach Abzug des prozentualen Anteils der Zellen, die vor der FITC-Behandlung doppelt-positiv waren, bei den Kontrolltieren 6 % und bei dem TNFR2-defizienten Tieren 4,5 % FITC- und MHC II-positiv Zellen beobachtet werden.

Anscheinend wirkt sich die Defizienz des TNF-Rezeptors 2 nicht auf die Migrationsfähigkeit der Langerhans-Zellen der TNFR2-defizienten Mäuse aus, da doppelt-positiv Zellen beobachtet werden konnten. Aufgrund des Unterschieds der migrierten Zellen kann man aber eine reduzierte Anzahl der FITC-positiven und MHC II-positiven Zellen aus TNFR2-defizienten Mäusen feststellen. Dies spricht dafür, daß der TNFR2 bei der Migration der Langerhans-Zellen eine Rolle spielen könnte.

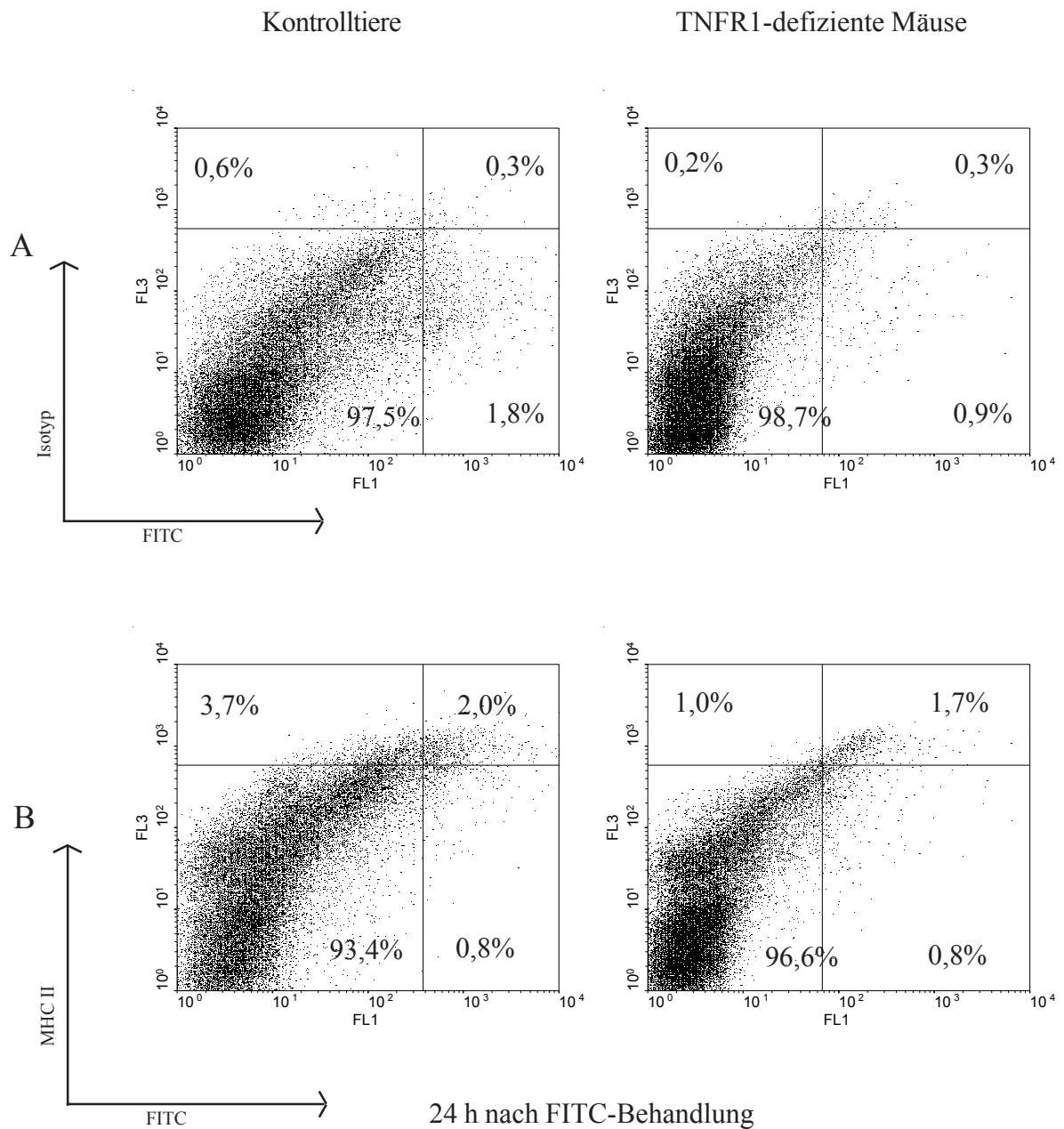


Abb. 7 Migrationsanalyse der Langerhans-Zellen von TNF-Rezeptor 1-defizienten- bzw. Kontroll-Mäusen

Die Tiere wurden 24 h vor Entnahme der cervicalen Lymphknoten mit 20 μ l 1% FITC in Azeton/Dibutylphthalsäure (1:1) auf beiden Ohren behandelt. Nach der Vereinzelnung der Zellen wurden sie anschließend mit anti-MHC II- (2G9) und Isotyp Ratte IgG2a-Antikörpern inkubiert. Mit Ziege-anti-Ratte IgG^{bio}-Antikörpern sowie Streptavidin-QR konnten die Primärantikörper gefärbt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC konnte im Kanal 1 (FL1) und QR in Kanal 3 (FL3) nachgewiesen werden. Es wurden für die Analyse 25000 Zellen verwendet. Die Quadranten wurden aufgrund der Isotypfärbungen gesetzt, wobei die Achse für FL1 der jeweiligen Gruppe angepasst wurde. In Abb. 7 A sind die FITC- sowie die Isotyp-Färbungen der Lymphknoten-Zellen von Kontrollmäusen und TNFR1-defizienten Mäusen 24h nach FITC-Behandlung dargestellt. Abb. 7 B zeigt die Färbungen für FITC und MHC II.

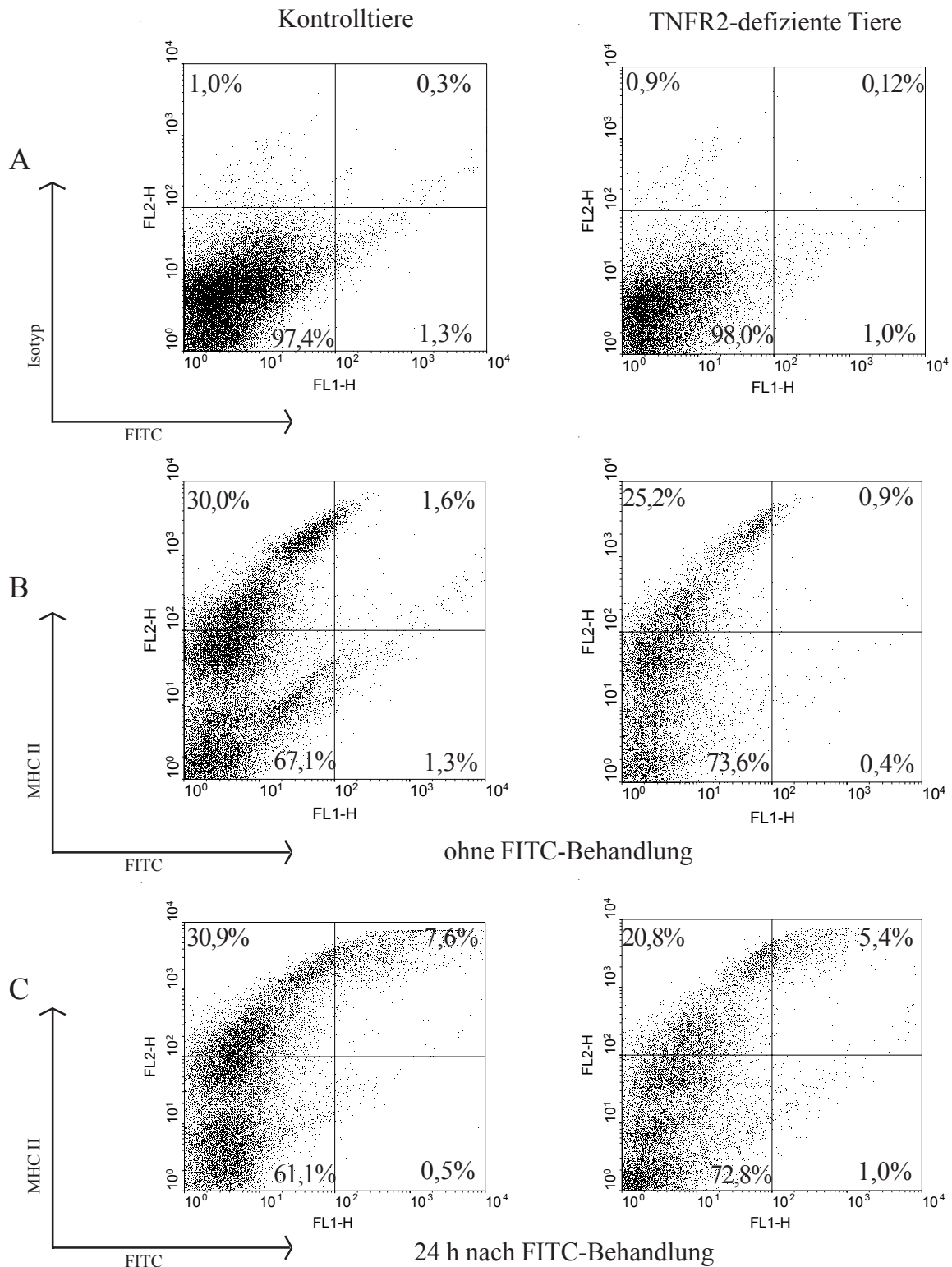


Abb. 8 Migrationsanalyse der Langerhans-Zellen von TNF-Rezeptor 2-defizienten Mäusen bzw. Kontrolltieren

Die Tiere wurden 24 h vor Entnahme der cervicalen Lymphknoten mit 20 μ l 1% FITC in Azeton/Dibutylphthalsäure (1:1) auf den rechten Ohren und mit dem Lösungsmittel auf den jeweils linken Ohren behandelt. Zur Kontrolle wurden die cervicalen Lymphknoten unbehandelter Mäuse verwendet. Nach der Vereinzelung der Zellen wurden diese mit Hilfe eines 14,5%igen Metrizamid-Gradienten angereichert. Die so gewonnenen Zellen konnten anschließend mit anti-MHC II- (2G9) bzw. Isotyp Ratte IgG2a-Antikörpern inkubiert und mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE}-Antikörpern gefärbt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC konnte im Kanal 1 (FL1) und PE in Kanal 2 (FL2) nachgewiesen werden. Für die Analyse wurden 10000 Zellen verwendet. Die Quadranten wurden aufgrund der Isotyp-Färbungen gesetzt. In Abb.8 A sind die Isotyp-Färbungen der Lymphknoten-Zellen unbehandelter Mäuse dargestellt. In Abb.8 B sind die FITC- sowie MHC II-Färbungen der Lymphknoten-Zellen unbehandelter Mäuse und in Abb.8 C FITC- bzw. MHC II-Färbungen von isolierten Lymphknoten-Zellen der Mäuse 24 h nach FITC-Behandlung dargestellt.

2 Expression von TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von epidermalen Zellen

Um die Expression von beiden TNF-Rezeptoren *in situ* auf murinen epidermalen Zellen untersuchen zu können, wurden Epidermal Sheets präpariert und fluoreszenzserologische Analysen durchgeführt. Die Schwierigkeiten bei diesen Versuchen bestanden darin, daß die TNF-Rezeptoren nur in geringer Dichte exprimiert werden und daß Langerhans-Zellen nur in einem geringen Prozentsatz in der epidermalen Zellsuspension vorhanden sind. Das erste Problem wurde mit einer Signalverstärkung über Tyramid behoben. Weiterhin konnten die Langerhans-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems so angereinigt werden, daß sie im FACS beobachtet werden konnten.

2.1 Untersuchungen zur Expression von TNFR1 und TNFR2 auf epidermalen Zellen mittels Epidermal Sheets

Da die TNF-Rezeptoren in geringer Dichte exprimiert wurden und dementsprechend schwer mit herkömmlichen Mitteln nachzuweisen waren, wurde eine fluoreszenzverstärkende Methode angewendet. Die Präparate wurden nach der Herstellung mit den angegebenen Primär- bzw. Sekundär-Antikörpern gefärbt, wobei der letzte Antikörper biotinyliert sein mußte. Durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase entstanden freie Radikale bei zugegebenen Tyramid-DTAF-Molekülen, die sich in der unmittelbaren Nähe der biotinylierten Antikörper niederließen. Durch die so erfolgte Verstärkung des Fluoreszenzsignals konnten auch die nur in geringer Zahl auf der Oberfläche vorhandenen Rezeptoren sichtbar gemacht werden. In Abb. 9 A, B, C, D wurden Epidermal Sheets von BL/6-Mäusen mit anti-TNFR1-, anti-TNFR2-, anti-MHC II- und Ratte IgG2a-Antikörpern gefärbt.

Abb. 9 A zeigt eine schwache Expression des TNFR1 auf Langerhans-Zellen, während in Abb. 9 B deutlich zu erkennen ist, daß murine epidermale Langerhans-Zellen den TNFR2 exprimieren. Die Expression des TNFR2 scheint hauptsächlich auf dem Zellkörper und weniger auf den Dendriten stattzufinden. Anhand der MHC II-Färbung in Abb. 9 C konnte die Funktionalität der Sekundärantikörper überprüft werden. Durch die Signalverstärkung sind die Dendriten der Langerhans-Zellen bis in die Verästelungen zu erkennen. Durch die Isotypfärbung in Abb. 9 D konnte ausgeschlossen werden, daß der Sekundärantikörper unspezifisch an Zellen band oder daß durch die Signalamplifikation unspezifische Signale verstärkt wurden. Mit Hilfe der Präparation der Epidermal Sheets konnte somit deutlich der TNFR2 auf murinen epidermalen Langerhans-Zellen nachgewiesen werden. Der TNFR1 scheint dagegen nur schwach exprimiert zu werden.

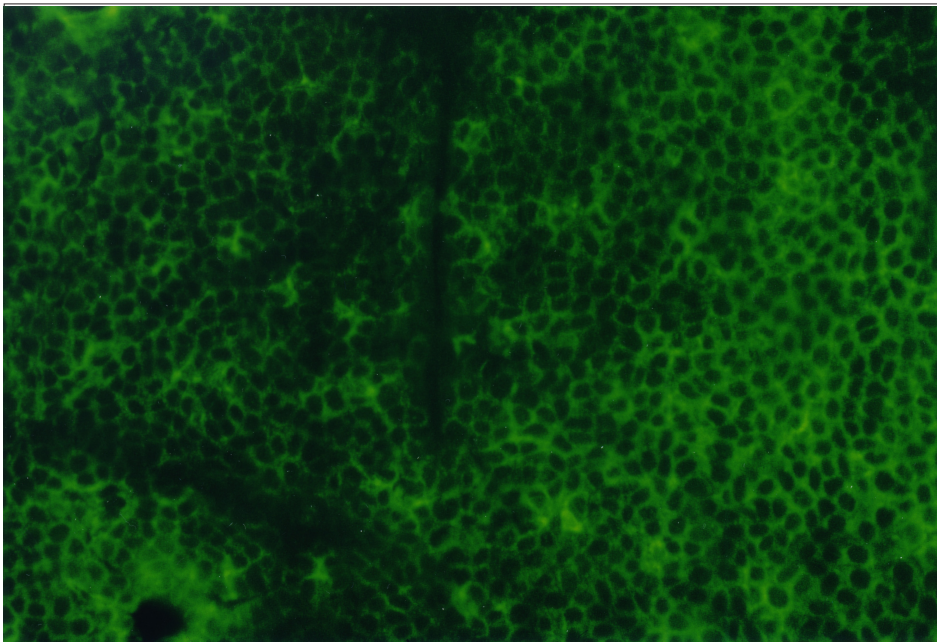


Abb. 9 A

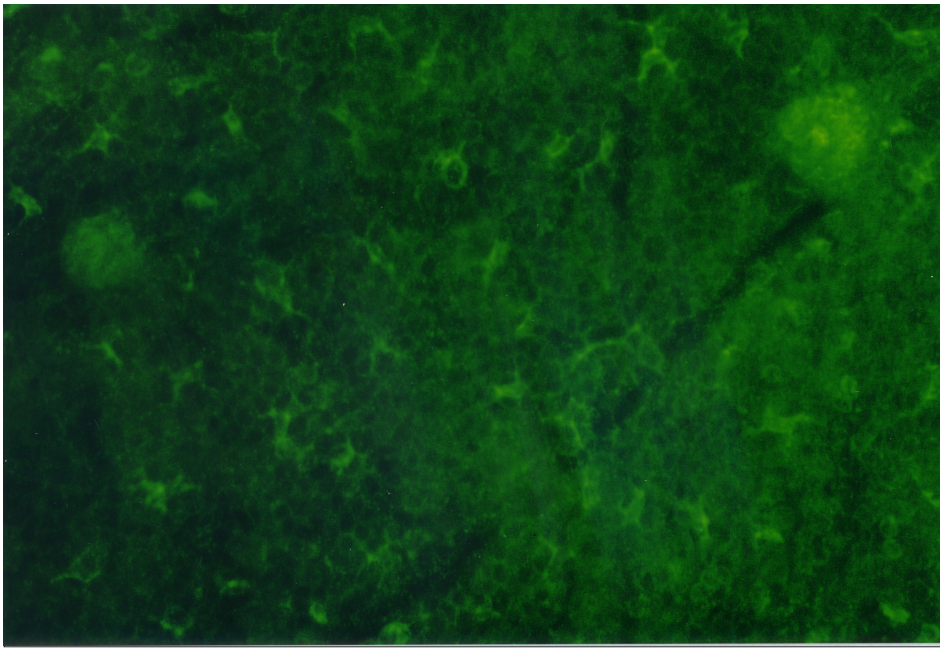


Abb. 9 B

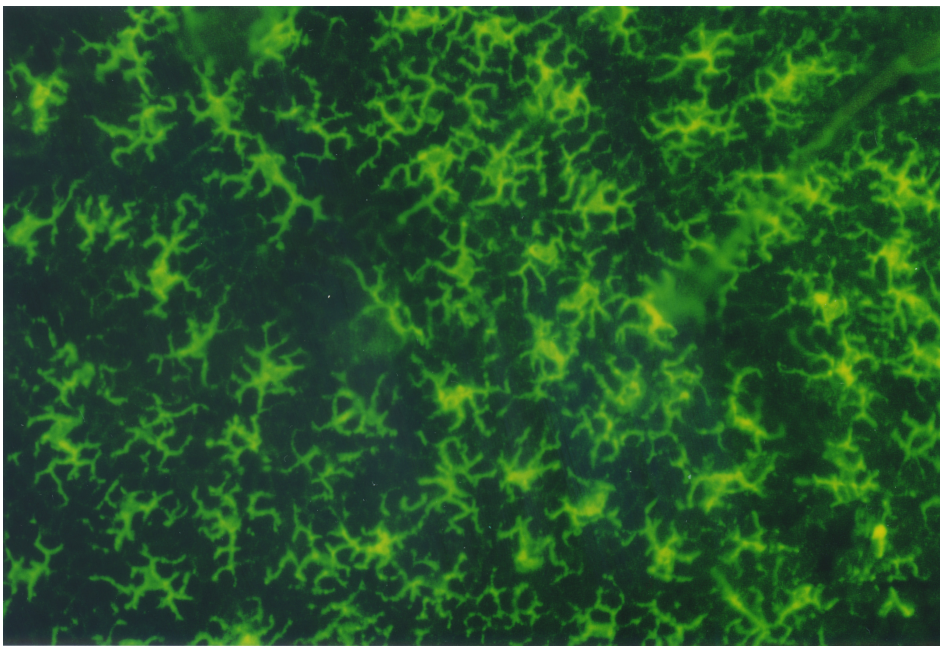


Abb. 9 C

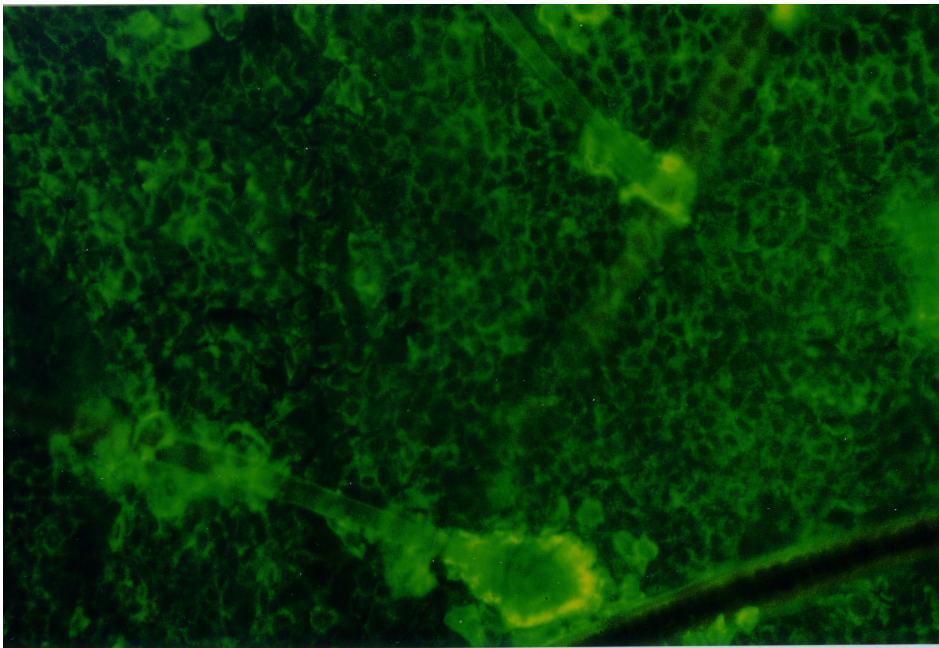
**Abb. 9 D**

Abb. 9 Epidermal Sheets von BL/6-Mäusen, die mit anti-TNFR1-, anti-TNFR2-, anti-MHC II- und Isotyp-Antikörpern gefärbt wurden

Die Präparate wurden, wie im Methodenteil 2.1.19 beschrieben, hergestellt. Die Färbung der MHC II-positiven Zellen erfolgte durch Zugabe von Kulturüberstand des Hybridoms 2G9. Die Färbung der TNF-Rezeptoren wurde mit Ratte-anti-Maus TNFR1- (1:10) sowie Ratte-anti-TNFR2-Antikörpern (1:20) durchgeführt. Die Isotypfärbung erfolgte mit Ratte IgG2a-Antikörpern. Alle Primärantikörper wurden mit Maus-anti-Ratte IgG^{bio}-Antikörpern gekoppelt. Anschließend wurde die Fluoreszenz durch die im Methodenteil 2.1.20 beschriebene Tyramid-Signalamplifikation verstärkt. Dazu wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen mit TNB-Puffer abgeblockt und danach die Epidermal Sheets mit Streptavidin-Peroxidase versetzt und anschließend gewaschen. Schließlich konnten nach Zugabe von Tyramid-DTAF und einem Waschschrift die Präparate eingedeckelt werden. Sie wurden bei einer 200x Vergrößerung fotografiert.

In Abb. 9A ist die Färbung des TNF-Rezeptors 1 dargestellt. Abb. 9B zeigt die TNF-Rezeptor 2-Färbung, Abb. 9C die Färbung der MHC II-Moleküle, und schließlich ist in Abb. 9D die Kontrollfärbung mit Ratte IgG2a -Antikörpern dargestellt.

2.2 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf Langerhans-Zellen und Keratinozyten

Um die TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von murinen Langerhans-Zellen und Keratinozyten nachweisen zu können, wurden Ratte-anti-Maus TNFR1- bzw. TNFR2-Antikörper verwendet. Diese konnten mit einem anti-Ratte IgG-Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, gefärbt werden. In Vorversuchen wurde die Expression der TNF-Rezeptoren auf Fibroblasten und T-Zellen untersucht, anschließend die Expression der TNF-Rezeptoren auf frisch isolierten und kultivierten Keratinozyten. Um eine hohe Reinheit der Langerhans-Zellen erzielen zu können, wurden die murinen Langerhans-Zellen mittels MHC II-Antikörpern mit dem MACS-System aus epidermalen Zellsuspensionen isoliert und die TNF-Rezeptoren mit den beschriebenen Antikörpern gefärbt.

2.2.1 Vorversuche zur Testung der anti-TNFR1- und anti-TNFR2-Antikörper

2.2.1.1 Expression von TNFR1 und TNFR2 auf Fibroblasten

Abb.10 stellt die fluoreszenzserologische Untersuchung der Maus-Fibroblastenlinie L929 dar. Die L929-Zellen wurden nach dem Ernten mit Ratte-anti-TNFR1^{bio}, Ratte-anti-TNFR2^{bio} oder Ratte IgG2a^{bio} inkubiert. Die Antikörper konnten mit Streptavidin-PE nachgewiesen werden. Deutlich ist eine positive Färbung der Zellen mit den anti-TNFR2-Antikörpern zu erkennen, während die anti-TNFR1-Antikörper nur in geringem Maße gefärbt haben.

In Abb.11 wurde die Expression von TNFR1 bzw. TNFR2 auf der murinen Fibrosarcom-Zelllinie WEHI-164 untersucht. Nachdem die Zellen mit Ratte-anti-TNFR1, Ratte-anti-TNFR2, Ratte-anti-CD44 oder dem Isotyp IgG2a inkubiert worden waren, konnten die Antikörper dann mit einem Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} nachgewiesen werden. Die Zellen exprimierten deutlich CD44, was zur Positivkontrolle für den verwendeten Sekundärantikörper diente. Der TNF-Rezeptor 2 wurde ebenfalls deutlich exprimiert, während der TNF-Rezeptor 1 bei dieser Zelllinie jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

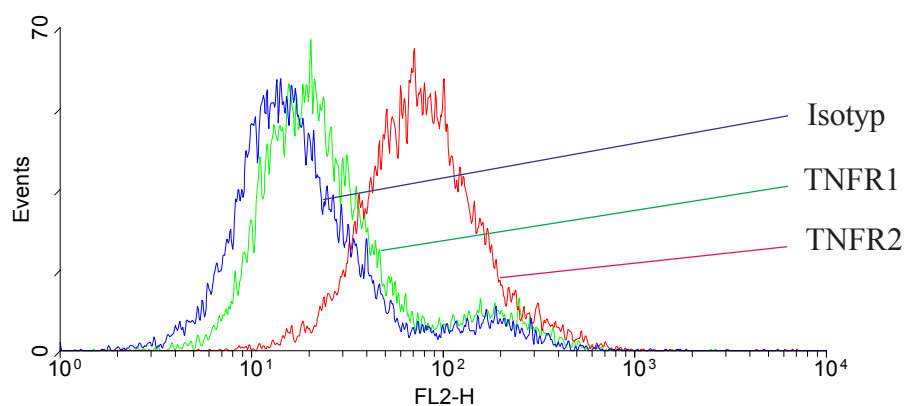


Abb. 10 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf L929-Zellen

Die Zellen wurden geerntet, mit anti-TNFR1^{bio} (1:5), anti-TNFR2^{bio} (1:10) und Isotyp Ratte IgG2a^{bio} (1:50) inkubiert. Anschließend wurden sie mit SA-PE gefärbt. Es wurden 10000 Zellen je Probe untersucht.

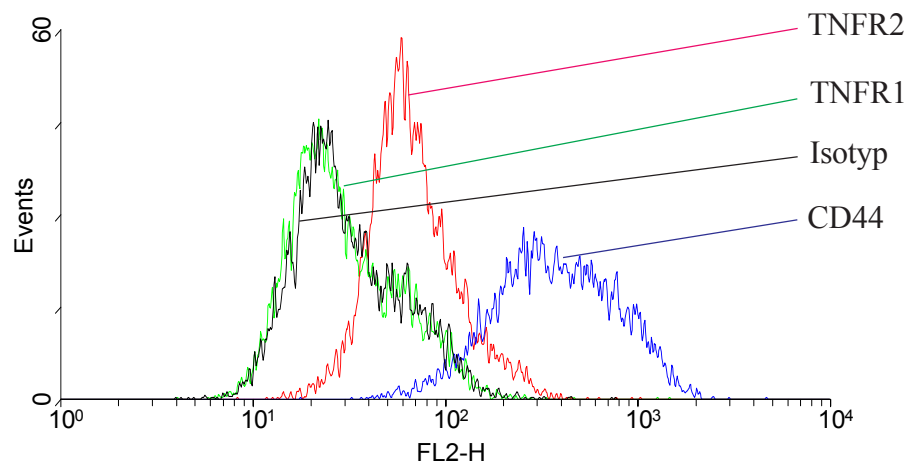


Abb. 11 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf WEHI 164-Zellen

Nach der Ernte der Zellen erfolgte die Absättigung ihrer Fc-Rezeptoren mit Maus IgG1 (1:50). Anschließend wurden die Zellen mit anti-TNFR1 (1:20), anti-TNFR2 (1:20), anti-CD44 (ÜS) und Isotyp IgG2a (1:200) inkubiert. Die Primärantikörper wurden dann mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} gefärbt. Es wurden 10000 Zellen je Probe untersucht.

2.2.1.2 Expression der TNFR1 und TNFR2 auf T-Zellen

Die folgenden Abbildungen stellen Versuche bezüglich der Expression der TNF-Rezeptoren bei dem Th1-ähnlichen T-Zellklon BK-OVA-1R bzw. dem Th2-ähnlichen T-Zellklon D10.G4.1 sowie der T-Lymphozytenlinie CTLL grafisch dar.

Abb.12 zeigt eine Histogramm-Darstellung der Färbung von BK-OVA-1R-Zellen. Deutlich kann man erkennen, daß die Zellen den TNFR2 exprimieren. Die Färbung der Transferrin-Rezeptoren diente zur Positivkontrolle für den verwendeten Sekundärantikörper Maus-anti-Ratte IgG^{bio}. Die Färbung der TNFR1 unterscheidet sich nicht von der Isotypkontrollfärbung. Offenbar besitzen die Zellen keinen TNFR1 in detektierbarer Dichte.

Abb.13 stellt die Färbung der D10.G4.1-Zellen dar. Zur Positivkontrolle des verwendeten Sekundärantikörpers Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} wurden wiederum die Transferrin-Rezeptoren gefärbt. Deutlich ist die Färbung des TNFR2 zu erkennen. Die Färbung des TNFR1 ist von der Isotypkontrolle etwas abgesetzt, was dafür spricht, daß die TNF-Rezeptoren 1 schwach exprimiert werden.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression der TNF-Rezeptoren auf CTLL-Zellen sind in Abb.14 dargestellt. Hier wurde zur Positivkontrolle eine CD44-Färbung durchgeführt, um den Sekundärantikörper testen zu können. Deutlich ist wieder die Färbung des TNF-Rezeptors 2 zu erkennen. Eine Expression des TNF-Rezeptors 1 scheinen diese Zellen nicht zu besitzen.

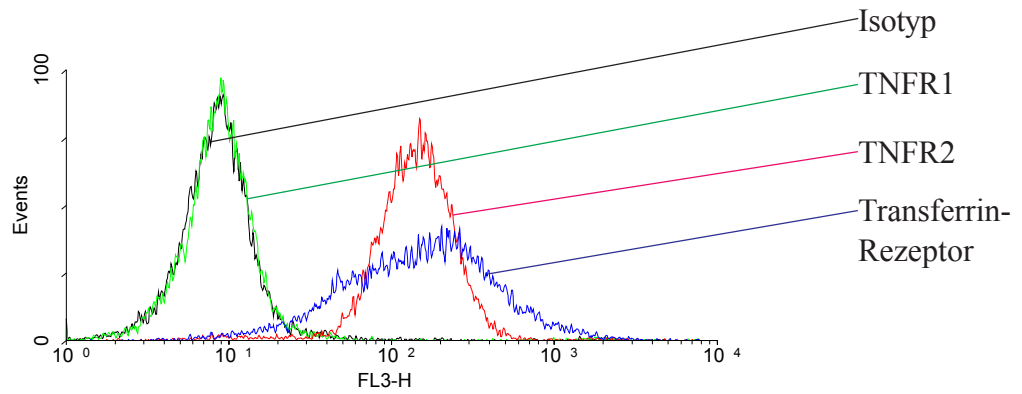


Abb. 12 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf BK-OVA-1R-Zellen

Die Zellen wurden geerntet und ihre Fc-Rezeptoren mit Maus IgG1 (1:100) abgesättigt. Im Anschluß daran wurden sie mit anti-TNFR1 (1:10), anti-TNFR2 (1:10), anti-Transferrin-Rezeptor (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:100) inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Maus-anti-Ratte IgG^{bio} und SA-QR gefärbt. Die toten Zellen wurden über PJ-Färbung selektiv ausgeschlossen. Je Probe wurden 10000 Zellen untersucht.

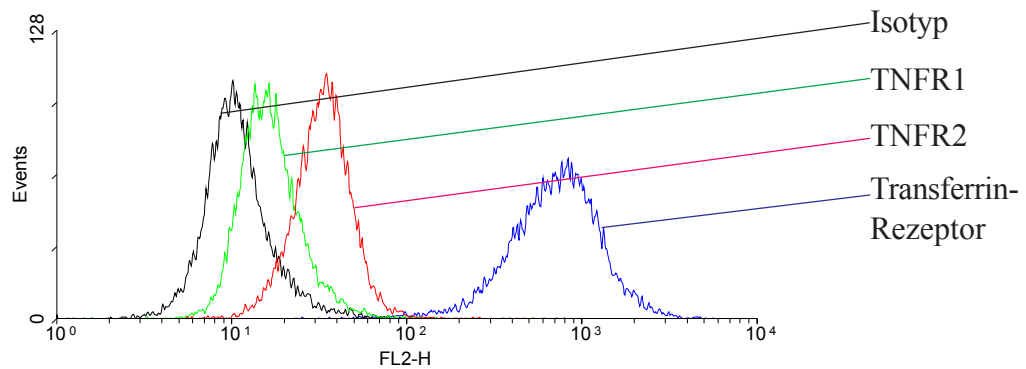


Abb. 13 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf D10.G4.1-Zellen

Nach der Ernte der Zellen erfolgte die Absättigung ihrer Fc-Rezeptoren mit Maus IgG1 (1:100). Anschließend wurden die Zellen mit anti-TNFR1 (1:20), anti-TNFR2 (1:20), anti-Transferrin-Rezeptor (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:200) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} (1:200) gefärbt. Es erfolgte die Untersuchung von 10000 Zellen je Probe.

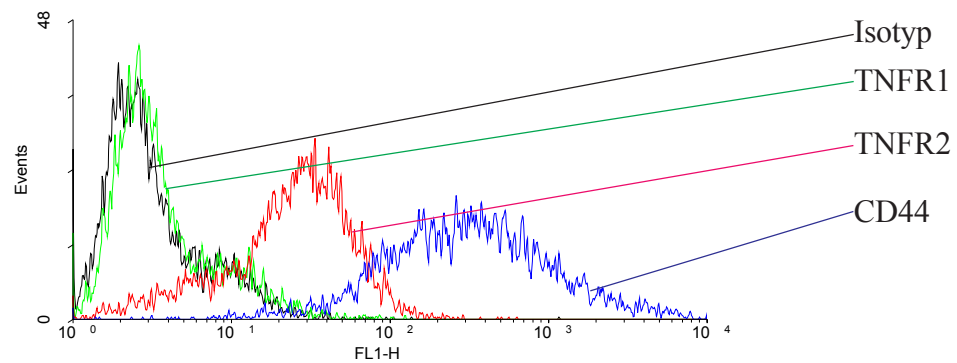


Abb. 14 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf CTLL-Zellen

Nach der Ernte der Zellen erfolgte die Absättigung ihrer Fc-Rezeptoren mit Maus IgG1 (1:100). Anschließend wurden die Zellen mit anti-TNFR1 (1:5), anti-TNFR2 (1:5), anti-CD44 (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:200) inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Ziege-anti-Ratte IgG^{bio} und SA-FITC gefärbt. Es wurden 5000 Zellen je Probe untersucht.

2.2.2 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212

Nachdem die Funktionalität der Antikörper des TNF-Rezeptor-Nachweises in den vorhergehenden Versuchen bestätigt wurde, konnte nun die adhärent wachsende Keratinozyten-Zelllinie PAM 212 in bezug auf die Expression der TNF-Rezeptoren getestet werden (Abb.15). Wiederum wurde als Positivkontrolle für den verwendeten Sekundärantikörper Maus-anti-Ratte IgG^{bio} eine CD44-Färbung gewählt. Die Färbung der beiden TNF-Rezeptoren unterscheidet sich deutlich von der Färbung der Isotypkontrolle. PAM 212-Zellen exprimieren demnach TNFR1 bzw. TNFR2.

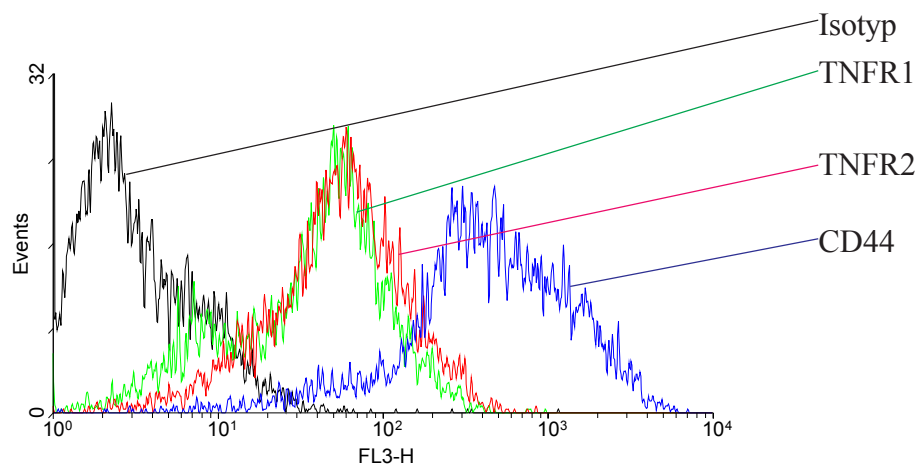


Abb. 15 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf PAM 212-Zellen

Nach der Ernte der Zellen erfolgte die Absättigung ihrer Fc-Rezeptoren mit Maus IgG1 (1:100). Anschließend wurden die Zellen mit anti-TNFR1 (1:5), anti-TNFR2 (1:10), anti-CD44 (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:200) inkubiert und mit Maus-anti-Ratte IgG^{bio} und SA-QR gefärbt. Es wurden 5000 Zellen je Probe getestet.

2.2.3 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 auf frisch isolierten und kultivierten murinen Langerhans-Zellen sowie Keratinozyten

Zur Klärung der wichtigen Fragestellung, ob murine Langerhans-Zellen und Keratinozyten TNF-Rezeptoren exprimieren, wurden frisch isolierte und kultivierte Langerhans-Zellen sowie Keratinozyten untersucht. Da jedoch in einer epidermalen Zellsuspension, wie sie aus der murinen Haut gewonnen werden kann, direkt nach der Isolation nur 1-3% bzw. nach der Kultivierung nach drei Tagen 6-10% der Zellen Langerhans-Zellen sind, mußten die Langerhans-Zellen für eine Analyse im FACS selektiv angereinigt werden. Dies wurde mit Hilfe des MACS-Microbeads-Systems bewerkstelligt:

Zunächst mußten aus der epidermalen Zellsuspension die toten Zellen über Annexin V-gekoppelte Beads entfernt werden. Danach erfolgte die Absättigung der Fc-Rezeptoren der Zellen mittels Maus IgG1. Anschließend wurden die Langerhans-Zellen mit einem Maus-anti-Maus I-A^b Antikörper, der biotinyliert oder direkt mit FITC gekoppelt war, gefärbt. Da in einer epidermalen Zellsuspension nur die Langerhans-Zellen MHC II-positiv sind, konnten sie dann über Streptavidin- oder anti-FITC-Antikörper gekoppelte Beads mit Hilfe eines Magneten selektiv angereichert werden. Die so gewonnenen Langerhans-Zellen wurden dann mit den Ratte-anti-Maus TNF-Rezeptor 1- bzw. Ratte-anti-Maus TNF-Rezeptor 2-Antikörpern sowie Ratte IgG2a-Antikörpern zur Kontrolle inkubiert. Mit Hilfe des Sekundäntikörpers Ziege-anti-Ratte IgG^{FITC} oder Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} konnte dann die Anfärbung der Ratten-Antikörper bewerkstelligt werden. Vor der Messung im FACS wurde noch eine PJ-Färbung zur selektiven Ausgrenzung der toten Zellen durchgeführt. Mit Hilfe der MHC II-Färbung der Langerhans-Zellen konnte zunächst eine Reinheitsbestimmung der gewonnenen Zellen vorgenommen werden und weiterhin zwischen MHC II-positiven (Langerhans-Zellen) und MHC II-negativen Zellen, hauptsächlich Keratinozyten, diskriminiert werden. Schließlich wurden MHC II-positive Zellen und MHC II-negative Zellen auf die Expression der beiden TNF-Rezeptoren hin untersucht. Repräsentative Experimente sind in den Abb. 17 und 19 grafisch dargestellt.

In Abb. 16 A, B, C und D ist die Gewinnung von frisch isolierten Langerhans-Zellen aus einer epidermalen Zellsuspension über Annexin V-Beads dargestellt. Es wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bei der Anreinigung entnommen und im FACS analysiert. Ausgehend von einem prozentualen Anteil von 4,3%, wurden die Langerhans-Zellen auf 98,5% angereinigt und auf Expression der TNF-Rezeptoren hin untersucht.

Abb. 17 A und B stellen die Färbungen von frisch isolierten epidermalen Zellen dar. Sowohl die MHC II-positiven als auch die -negativen Zellen wurden mit Ratte-anti-TNFR1- bzw. Ratte-anti-TNFR2- sowie Ratte-anti-MHC II-Antikörpern inkubiert, mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} gefärbt und im FACS ausgewertet. Die frisch isolierten, epidermalen Langerhans-Zellen zeigten weder eine Expression des TNFR1 noch des TNFR2 (Abb. 17 A). Bei den MHC II-negativen Zellen konnte ebenfalls keine TNF-Rezeptor-Färbung (Abb. 17 B) festgestellt werden.

Abb. 18 A, B, C und D zeigen die Anreicherung der kultivierten Langerhans-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems. Die kultivierten Langerhans-Zellen wurden, ausgehend von einem 25,2%igen Anteil, auf 96,7% angereinigt und anschließend auf die Expression der TNF-Rezeptoren hin untersucht.

Abb. 19 A und B befassen sich mit der Färbung der TNF-Rezeptoren bei kultivierten epidermalen Zellen. Auch hier wurden sowohl die MHC II-positiven als auch die -negativen Zellen mit Ratte-anti-TNFR1- bzw. Ratte-anti-TNFR2- sowie Ratte-anti-MHC II-Antikörpern inkubiert und mit Ziege-anti-Ratte IgG^{FITC} gefärbt. Die Langerhans-Zellen zeigten eine Färbung des TNFR2, nicht jedoch des TNFR1 (Abb. 19 A). Die MHC II-negativen Zellen wiesen keinerlei positive Färbung auf (Abb. 19 B). Demnach exprimieren kultivierte epidermale Langerhans-Zellen nur den TNF-Rezeptor 2.

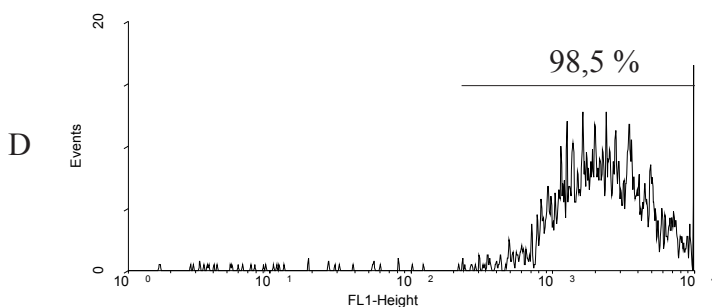
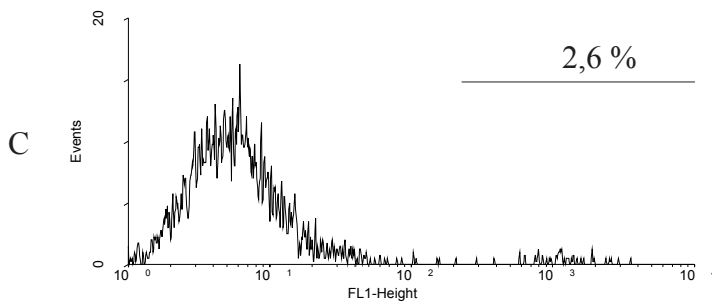
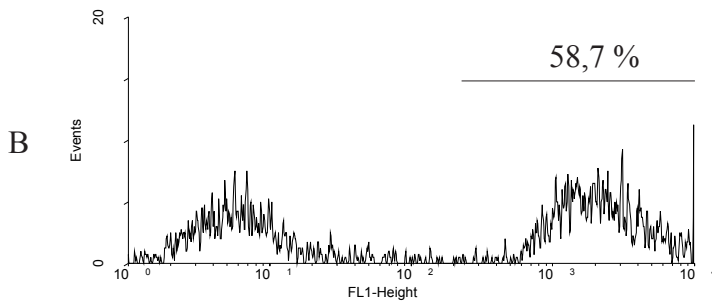
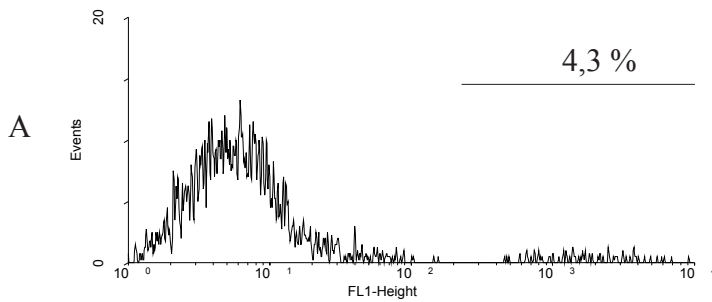
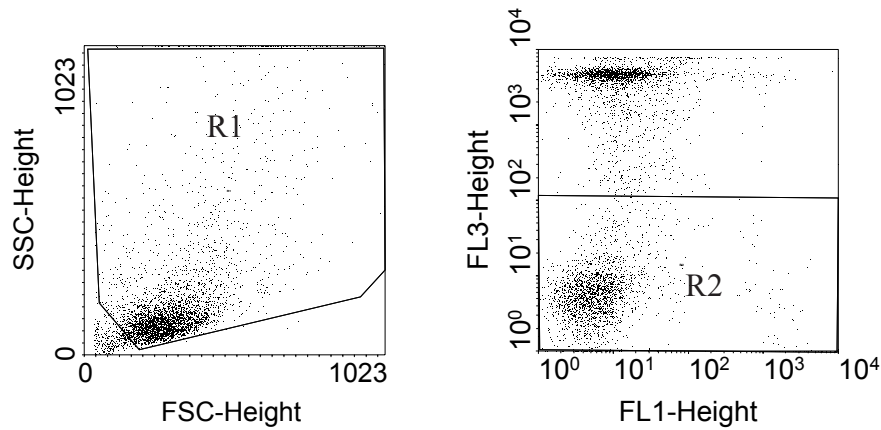


Abb.16 Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer frischen epidermalen Zellsuspension mittels MicroBeads (MACS) nach vorheriger Entfernung der toten Zellen über Annexin V-Beads

Die epidermale Zellsuspension wurde nach Entfernung der toten Zellen und der Anreicherung der MHC II-positiven Zellen im FACS auf ihren Anreicherungsgrad hin untersucht. Dazu wurde zunächst eine Region (R1) in der SSC/FSC-Darstellung gewählt, die analysiert werden sollte. Anschließend wurden alle PJ-positiven Zellen, die als FL3-positiv dargestellt wurden, durch die Wahl der Region 2 (R2) von der Messung ausgeschlossen. Die selektiv isolierten Zellen wurden in der Histogramm-darstellung auf die MHC II-Färbung hin im FL1-Kanal untersucht.

In Abb. A sind die Zellen vor der Anreicherung dargestellt. Die Anreicherung erfolgte in zwei Schritten, d.h. nach Anreicherung der MHC II-positiven Zellfraktion über die erste Säule wurde sie in einem zweiten Schritt nochmal mit Hilfe einer zweiten Säule gereinigt. Abb. B zeigt die MHC-II angereinigten Zellen bei der Anreicherung nach dem ersten Schritt. Abb. C zeigt die MHC II-negativen Zellen nach dem ersten Anreicherungsschritt. In Abb. D sind die Zellen dargestellt, die nach dem zweiten Anreicherungsschritt als MHC II-positiv Zellen gewonnen wurden. Die Reinheit der hier isolierten Langerhans-Zellen betrug 98,5%.

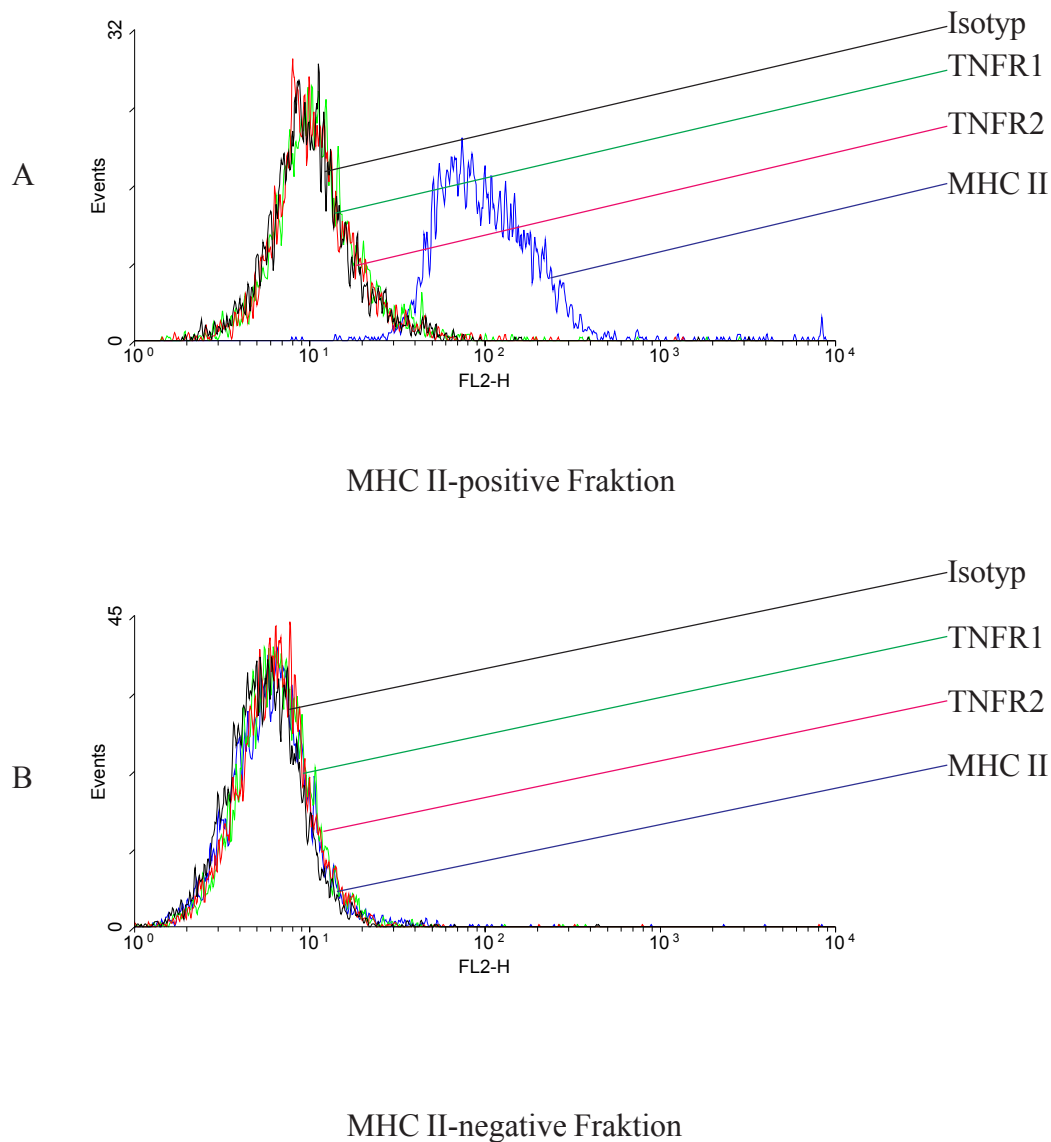


Abb. 17 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 bei frisch isolierten Epidermalzellen

Nach der Präparation wurden die Zellen vom $H-2^b$ -Typ mit Annexin V-Beads ($100 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von $500 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin V-Puffer wurden die toten Zellen mit Hilfe einer LS^+ -Säule entfernt. Die Fc-Rezeptoren der verbliebenen Zellen konnten mit Maus IgG1 (1:50) abgesättigt werden. Anschließend wurden sie mit Maus-anti-Maus I-A^b FITC (1:100) für 20 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen wurden anti-FITC-Beads ($10 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) für einen Zeitraum von 15 Minuten hinzugefügt. Mit einem Gesamtvolumen von $500 \mu\text{l}$ wurde schließlich die Zellsuspension auf eine MACS-Säule vom Typ 422-02 gegeben. Die so angereicherte Zellpopulation wurde erneut auf eine zweite Säule des gleichen Typs gegeben. Die durch den Magneten zurückgehaltene Fraktion (A) und die eluierte Fraktion (B) wurden dann mit anti-TNFR1 (1:20), anti-TNFR2 (1:20), 2G9 (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:200) inkubiert und mit Ziege-anti-Ratte IgG^{PE} gefärbt. Nach Bestimmung des Anreicherungsgrads wurden die toten Zellen über PJ-Färbung selektiv von der FACS-Messung ausgeschlossen. Die MHC II-positiven Zellen wurden in Abb. 17 A dargestellt und die MHC II-negativen Zellen in Abb. 17 B.

Die Anreicherung der Langerhans-Zellen belief sich bei diesem Experiment auf 98,5% (Abb. 16). Es erfolgte die Untersuchung von 3000 Zellen in Abb. 17 A und 5000 Zellen in Abb. 17 B.

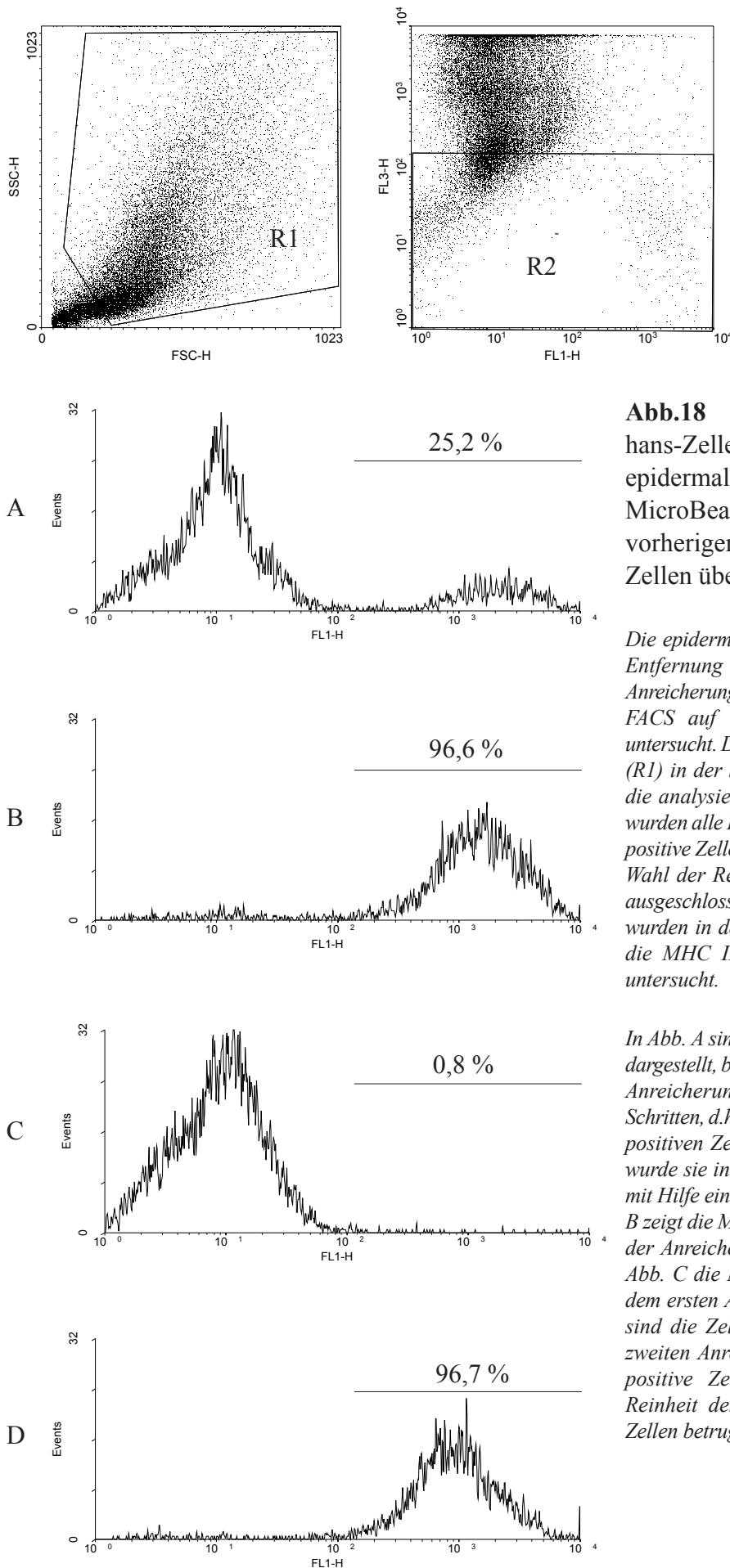


Abb.18 Isolierung von Langerhans-Zellen aus einer kultivierten epidermalen Zellsuspension mittels MicroBeads (MACS) nach vorheriger Entfernung der toten Zellen über Annexin V-Beads

Die epidermale Zellsuspension wurde nach Entfernung der toten Zellen und der Anreicherung der MHC II-positiven Zellen im FACS auf ihren Anreicherungsgrad hin untersucht. Dazu wurde zunächst eine Region (R1) in der SSC/FSC-Darstellung gewählt, die analysiert werden sollte. Anschließend wurden alle PJ-positiven Zellen, die als FL3-positiv dargestellt wurden, durch die Wahl der Region 2 (R2) von der Messung ausgeschlossen. Die selektiv isolierten Zellen wurden in der Histogramm-darstellung auf die MHC II-Färbung hin im FL1-Kanal untersucht.

In Abb. A sind die Zellen nach der 3d-Kultur dargestellt, bevor sie angereichert wurden. Die Anreicherung erfolgte wiederum in zwei Schritten, d.h. nach Anreicherung der MHC II-positiven Zellfraktion über die erste Säule wurde sie in einem zweiten Schritt nochmal mit Hilfe einer zweiten Säule gereinigt. Abb. B zeigt die MHC-II-angereinigten Zellen bei der Anreicherung nach dem ersten Schritt, Abb. C die MHC II-negativen Zellen nach dem ersten Anreicherungsschritt. In Abb. D sind die Zellen dargestellt, die nach dem zweiten Anreicherungsschritt als MHC II-positiv Zellen gewonnen wurden. Die Reinheit der hier isolierten Langerhans-Zellen betrug 96,7%.

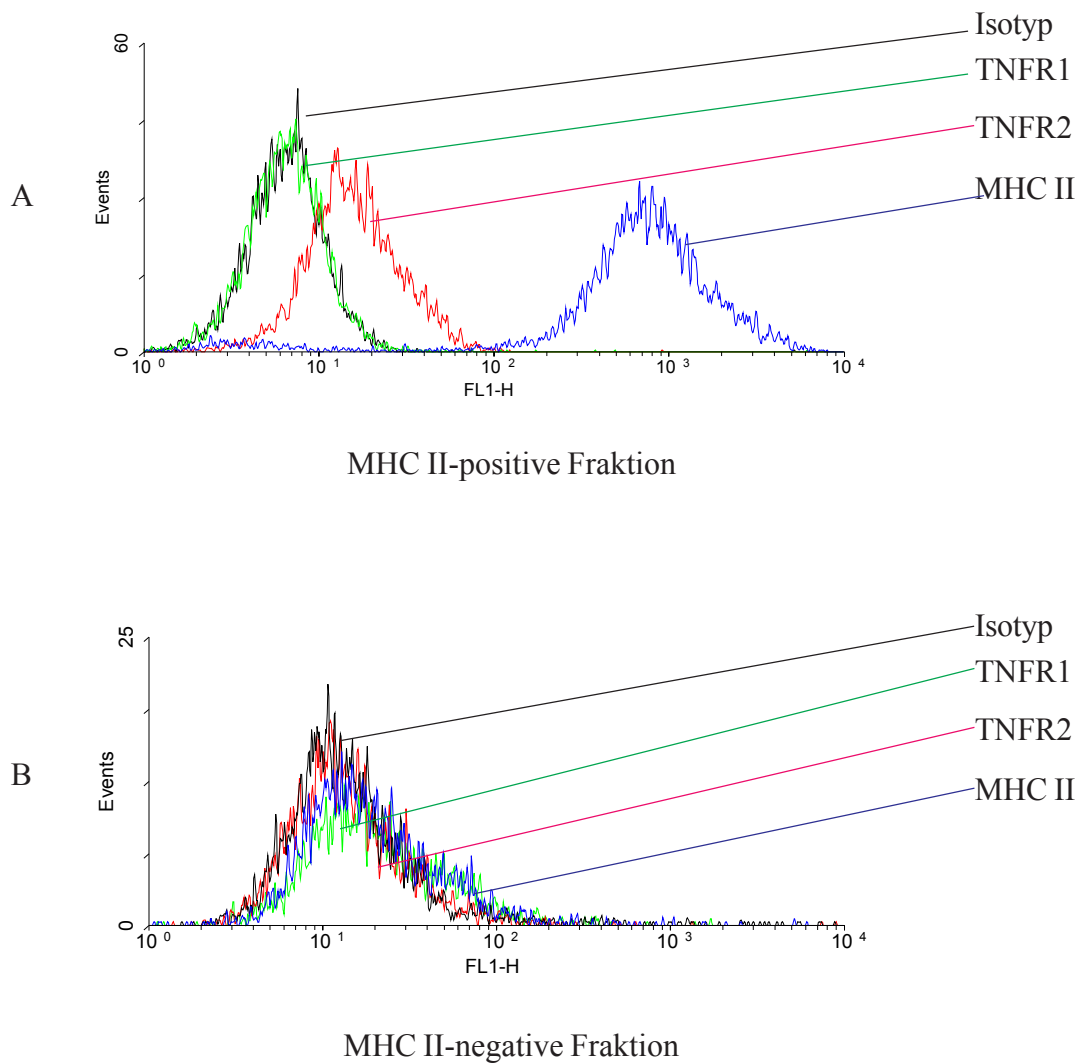


Abb. 19 Zytofluorometrische Analyse der Expression von TNFR1 und TNFR2 bei kultivierten Epidermalzellen

Nach der Präparation wurden die Zellen vom H-2^b-Typ in einer Dichte von $1,2 \times 10^6/\text{ml}$ kultiviert, am Tag 3 geerntet und mit Annexin V-Beads ($100 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) für einen Zeitraum von 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von $500 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin V-Puffer wurden die toten Zellen mit Hilfe einer LS⁺-Säule entfernt. Die Fc-Rezeptoren der verbliebenen Zellen konnten mit Maus IgG1 (1:50) abgesättigt werden. Anschließend wurden sie mit Maus-anti-Maus I-A^b bio (1:100) für 20 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen wurden Streptavidin-Beads ($10 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) für 15 Minuten hinzugefügt. Mit einem Gesamtvolumen von $500 \mu\text{l}$ wurde schließlich die Zellsuspension auf eine MACS-Säule vom Typ 422-02 gegeben. Die so angereicherte Zellpopulation wurde erneut auf eine zweite Säule des gleichen Typs gegeben. Die durch den Magneten zurückgehaltene Fraktion (A) und die eluierte Fraktion (B) wurden dann mit anti-TNFR1 (1:5), anti-TNFR2 (1:10), 2G9 (ÜS) und Isotyp Ratte IgG2a (1:100) inkubiert und mit Ziege-anti-Ratte IgG^{FITC} gefärbt. Nach Bestimmung des Anreicherungsgrads konnten die toten Zellen über PJ-Färbung selektiv von der FACS-Messung ausgeschlossen werden. Die MHC II-positiven Zellen wurden grafisch in Abb.19 A und die MHC II-negativen Zellen in Abb.19 B dargestellt.

Der Anreicherungsgrad der Langerhans-Zellen betrug bei diesem Experiment 96,7% (Abb. 18). Es wurden 5000 Zellen in Abb. 19 A und 2000 Zellen in Abb. 19 B untersucht.

3 Untersuchungen zur Expression der mRNA von TNF-Rezeptoren

Wie aus dem vorherigen Kapitel entnommen werden konnte, weisen kultivierte epidermale Langerhans-Zellen auf ihrer Zelloberfläche zumindest den TNFR2 auf. Nachfolgend wurde nun auf mRNA-Ebene untersucht, ob Langerhans-Zellen mRNA für einen oder beide TNF-Rezeptoren exprimieren. Dazu wurde zunächst aus frisch isolierten epidermalen und kultivierten epidermalen Langerhans-Zellen, die mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereichert wurden, mRNA gewonnen und durch die reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Aufgrund der bekannten Sequenz der TNF-Rezeptoren konnten Primer synthetisiert und die cDNA mit Hilfe der Polymerase-Amplifikations-Reaktion vervielfältigt werden. Diese DNA wurde mittels eines Gelelektrophorese-Auswertungssystems analysiert. In einem ersten Versuch wurden CTLL-Zellen auf die Expression von mRNA der TNF-Rezeptoren untersucht. Zur Kontrolle für die mRNA-Präparation wurde die Amplifikation des Haushaltgens 3-Phosphoglyceratkinase gewählt. In Abb. 20 sind die Ergebnisse dargestellt.

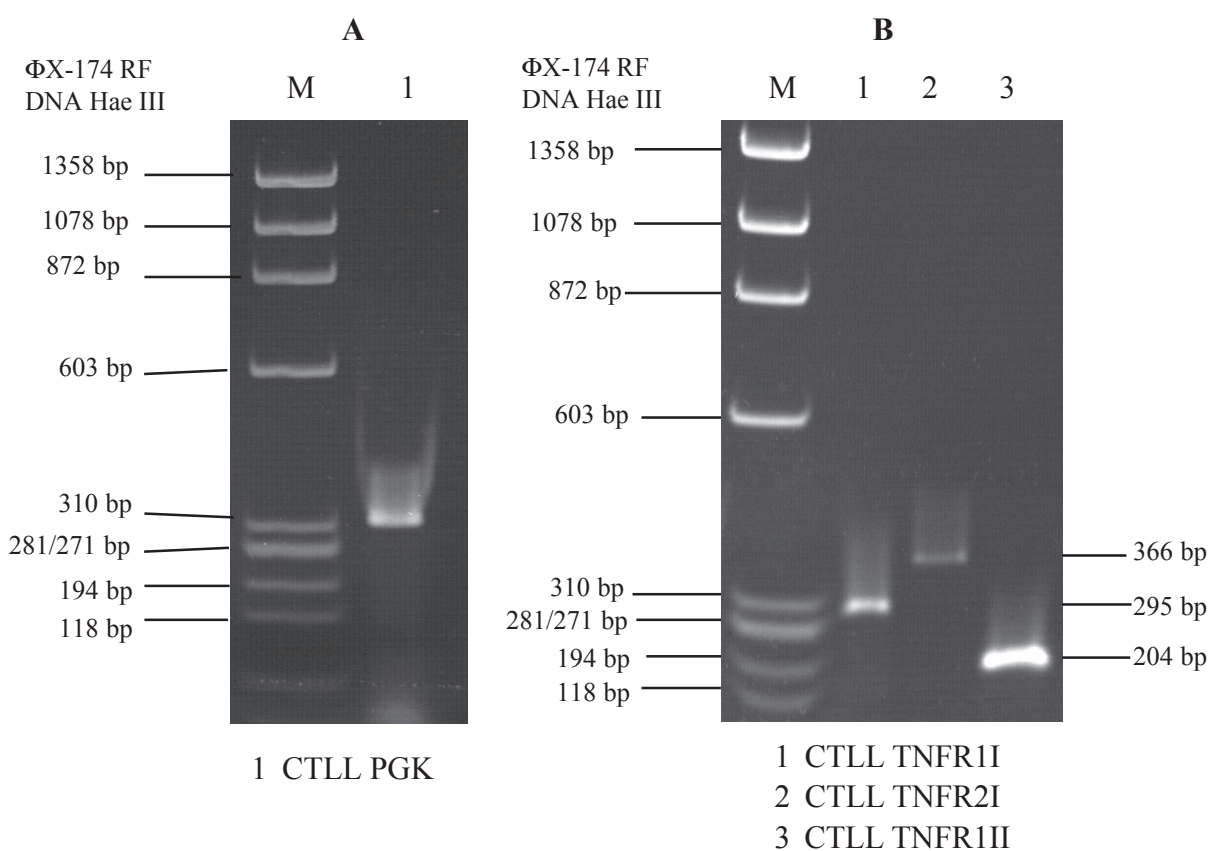


Abb. 20 RT-PCR von TNFR1 und 2 sowie der PGK bei CTLL-Zellen

Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA von CTLL-Zellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 µl Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Davon konnte 1 µl für die R.T.-Reaktion verwendet werden. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 µl Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 µl entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt. Die Expression des TNFR1 bzw. 2 wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 39 Zyklen bei 56 °C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C).

Die Analyse der 3-Phosphoglyceratkinase (PGK) wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 30 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Für den Nachweis des TNFR1 wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet, die mit I oder II gekennzeichnet sind. In Abb.20 A ist die PGK- und in 20 B die TNFR1- bzw. TNFR2-Analyse dargestellt.

Abb. 20 A stellt das Amplifikationsprodukt der exprimierten PGK dar. Auf Abb. 20 B ist zu erkennen, daß CTLL-Zellen in Spur 1 eine Bande von 295 bp besitzen. Dies entspricht der erwarteten Produktgröße des Primerpaars TNFR1I. Das Primerpaar TNFR2I produzierte in Spur 2 ein erwartetes Produkt von 366 bp, und in Spur 3 ist das PCR-Produkt von 204 bp der Primer TNFR3I zu erkennen. Demnach amplifizieren die verwendeten Primer die erwarteten Produkte, und CTLL-Zellen exprimieren mRNA für beide TNF-Rezeptoren.

Abb. 21 A, B, C, D stellen PCR-Analysen zur Expression der mRNA von beiden TNF-Rezeptoren bei frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen dar. In Abb. 21 A ist die PGK-Analyse der frisch isolierten und kultivierten epidermalen Zellen dargestellt. Wie aus Abb. 21 B ersichtlich, exprimieren frisch isolierte sowie kultivierte epidermale Zellsuspensionen mRNA für den TNFR1.

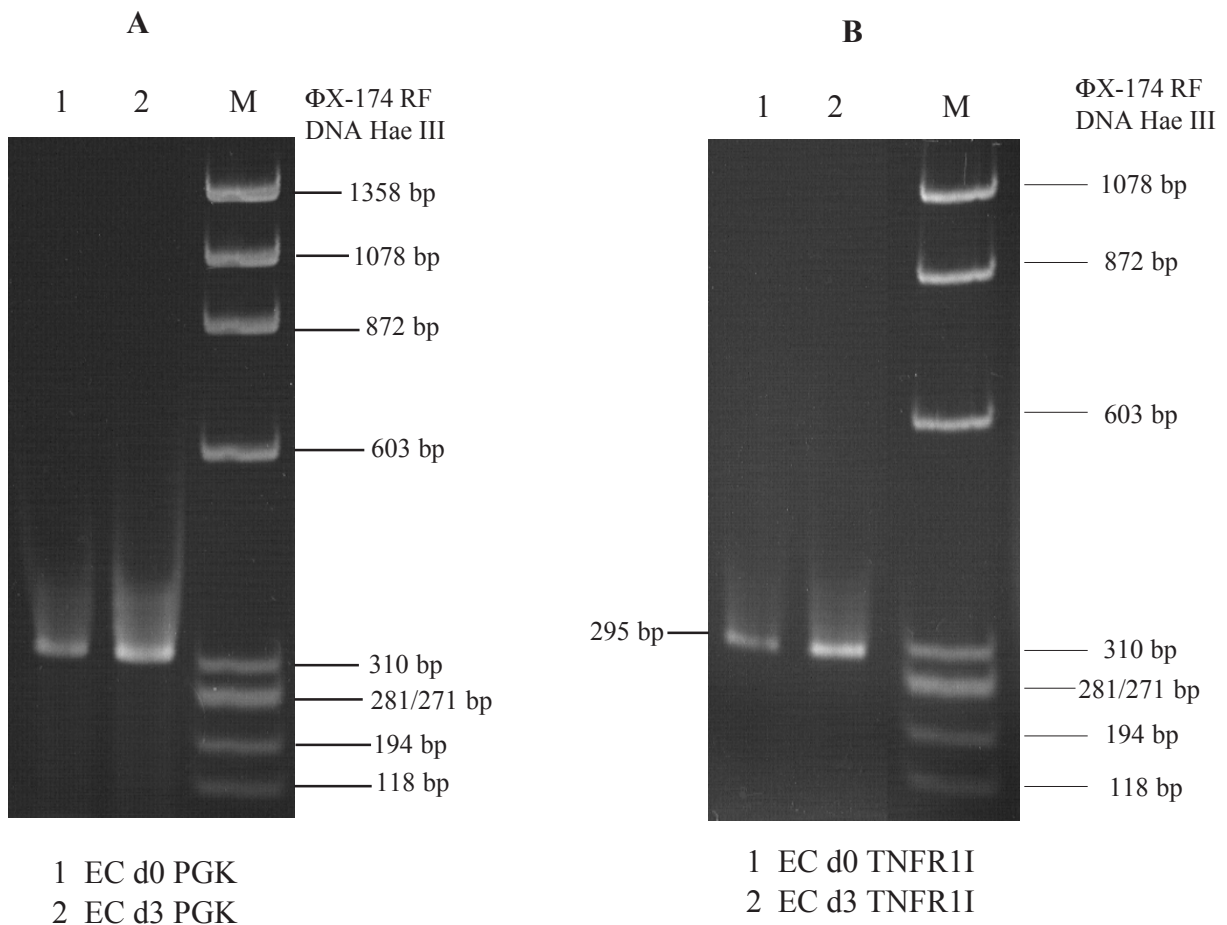


Abb. 21 RT-PCR mit TNFR1 und 2 bei frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen

Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA von frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 µl Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurde 1 µl für die R.T.-Reaktion verwendet. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 µl Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 µl entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt.

Die Expression des TNFR1 wurde mit 1 Zyklus bei 61°C, 2 Zyklen bei 60°C, 2 Zyklen bei 59°C und 30 Zyklen bei 58 °C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C). Die Analyse des TNFR2 wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 35 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Für den Nachweis des TNFR1 wurde das Primerpaar I verwendet. Abb.21 A stellt die Analyse der PGK-Expression bei frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen, Abb.21 B die Analyse der TNFR1-mRNA bei frisch isolierten Epidermalzellen dar.

Daß frisch isolierte Epidermalzellen ebenfalls in der Lage sind, mRNA für den TNFR2 zu exprimieren, ist aus Abb. 21 C zu schließen. Weiterhin wurde, wie aus Abb. 21 D entnommen werden kann, die Expression der TNFR1 bzw. TNFR2 bei kultivierten epidermalen Zellsuspensionen untersucht. Drei-Tage-kultivierte Epidermalzellen können demnach sowohl die TNFR1- als auch TNFR2-mRNA bilden. Es konnten sowohl bei frisch isolierten als auch bei kultivierten Epidermalzellen mRNA für die Expression des TNFR1 und TNFR2 festgestellt werden.

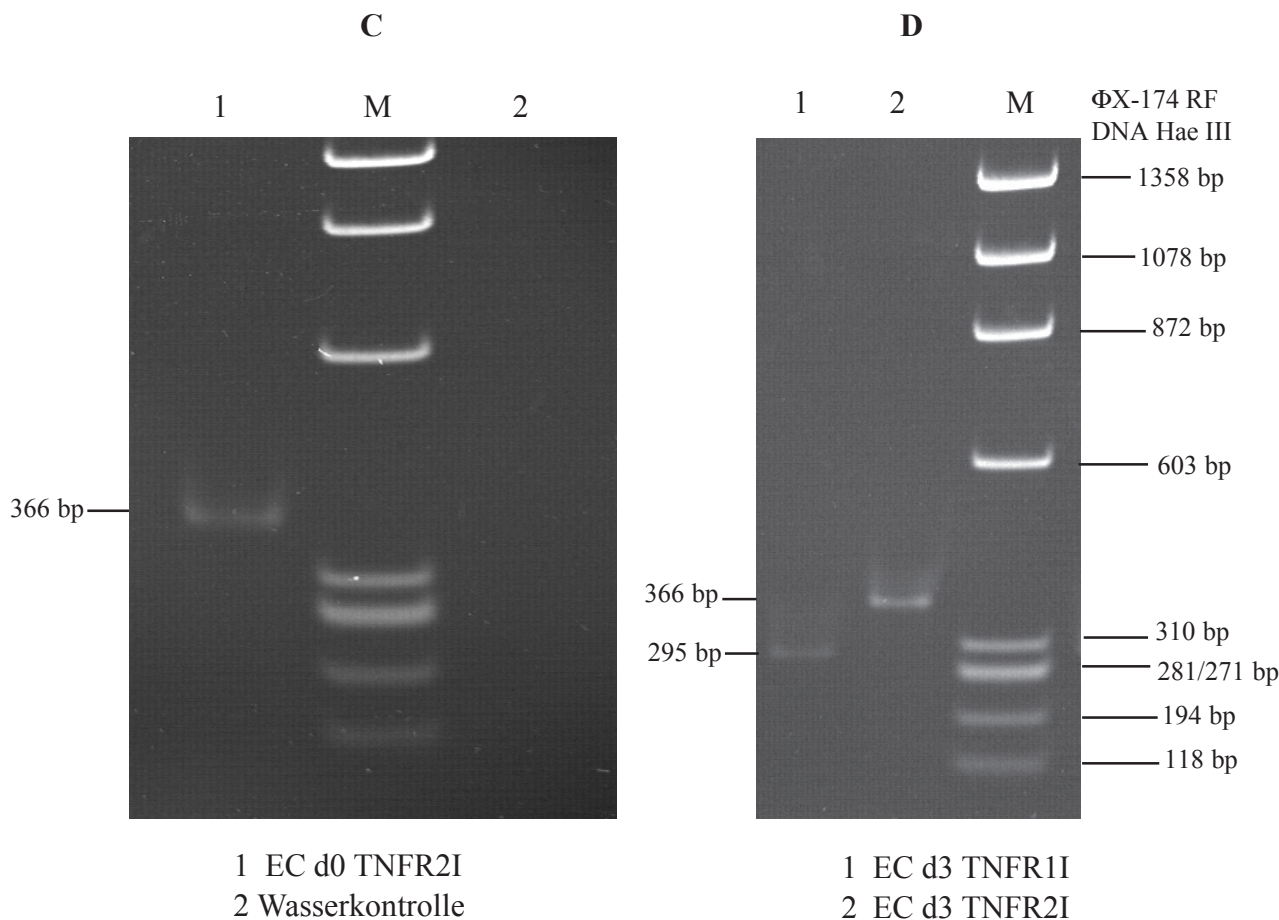


Abb. 21 RT-PCR mit TNFR1 und 2 sowie PGK bei frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen

Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA von frisch isolierten und kultivierten Epidermalzellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 µl Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurde 1 µl für die R.T.-Reaktion verwendet. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 µl Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 µl entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt.

Die Expression des TNFR1 bzw. 2 wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 39 Zyklen bei 56 °C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C). Die Analyse der PGK wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 30 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Für den Nachweis des TNFR1 bzw. TNFR2 wurden die Primerpaare I verwendet. Abb. 21 C stellt die PCR-Reaktion der TNFR2-mRNA bei frisch isolierten Epidermalzellen und Abb. 21 D die PCR-Reaktionen der TNFR1- bzw. TNFR2-mRNA bei kultivierten Epidermalzellen dar.

Um konkret überprüfen zu können, ob Langerhans-Zellen in der Lage sind, mRNA für beide TNF-Rezeptoren zu exprimieren, wurden LC aus einer epidermalen Zellsuspension mit Hilfe von paramagnetischen Beads (Dynal) angereinigt. Die Reinheit der frisch isolierten Langerhans-Zellen betrug 93%. Anschließend wurde eine Präparation der mRNA sowie RT-Reaktion durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte dazu sind in den Abb. 22 A, B dargestellt. Aus Abb. 22 A ist die PGK-Analyse der mRNA-Präparation und aus Abb. 22 B die Expression der TNFR1-mRNA bei frisch isolierten Langerhans-Zellen ersichtlich. Frisch isolierte LC weisen bei beiden TNFR1-Primerpaaren die erwarteten Amplifikationsprodukte auf.

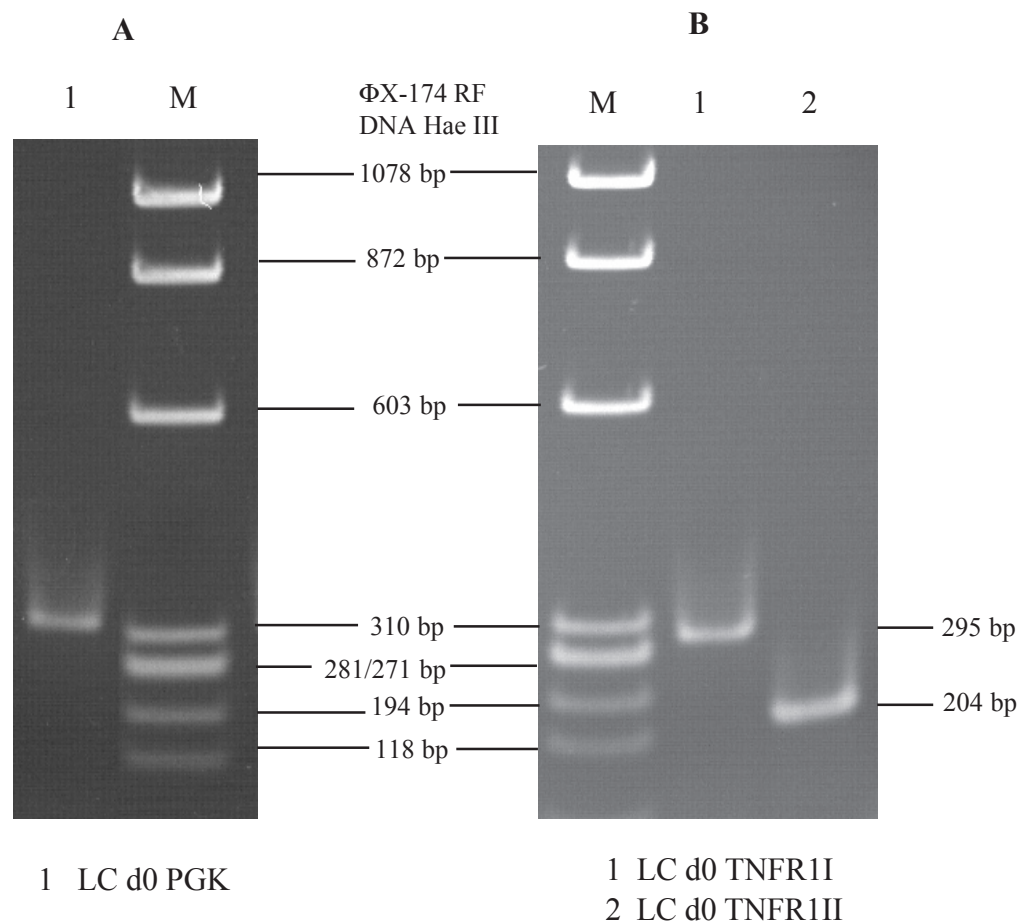


Abb. 22 RT-PCR mit TNFR1 sowie PGK bei frisch isolierten Langerhans-Zellen

Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA von frisch isolierten Langerhans-Zellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Die Langerhans-Zellen wurden mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereinigt. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 μ l Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurde 1 μ l für die R.T.-Reaktion verwendet. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 μ l Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 μ l entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt.

Die Expression des TNFR1 wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 39 Zyklen bei 56°C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C). Die Analyse der PGK wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 30 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Für den Nachweis des TNFR1 wurden die Primerpaare I und II verwendet. Abb.22 A stellt die PGK-Analyse und Abb.22 B die TNFR1-Analyse von frisch isolierten Langerhans-Zellen dar.

Gemäß Abb. 23 A, B wurde die Expression der TNFR1-mRNA bei frisch isolierten und kultivierten Langerhans-Zellen, die mit Beads (MACS) angereichert wurden, untersucht. Die Langerhans-Zellen-depletierte Fraktion (KC), die hauptsächlich aus Keratinozyten besteht, wurde ebenfalls für diesen Versuch verwendet. Die Reinheit der kultivierten Langerhans-Zellen betrug 94,1%. Die frisch isolierten bzw. kultivierten KC wiesen 0,6% bzw. 1% Langerhans-Zellen in der Gesamtpopulation auf.

In Abb. 23 A ist die PGK-Analyse der verwendeten mRNA wiedergegeben, wobei die Spur 2 (mRNA von kultivierter Keratinozyten) kein Amplifikationsprodukt aufwies. Abb. 23 B zeigt die PCR-Produkte der TNFR1-mRNA, die mit dem Primerpaar TNFR1II amplifiziert wurden. Wie schon aus der vorherigen Abbildung zu entnehmen war, exprimieren frisch isolierte Langerhans-Zellen sowie kultivierte Langerhans-Zellen mRNA für den TNFR1. Die frisch isolierten LC-depletierten Epidermalzellen sind ebenfalls zur Bildung von TNFR1-mRNA in der Lage. Die kultivierten LC-depletierten Epidermalzellen haben kein Amplifikationsprodukt, was aber im Hinblick auf die PGK-Analyse auf eine nicht vollständige mRNA-Präparation zurückzuführen ist.

In einem abschließenden Experiment wurde die Expression der mRNA beider TNF-Rezeptoren unter dem Einfluß des Kontaktallergens DNFB untersucht. Dazu wurde DNFB auf beide Ohren der Mäuse aufgetragen, nach 2, 4, 6 und 8 h wurden die Ohren entnommen und die Zellen präpariert. Nach der mRNA-Präparation und RT-Reaktion konnten PCR-Analysen bezüglich der Expression der TNFR1- und TNFR2-mRNA durchgeführt werden. Die verwendete Menge der mRNA wurde semiquantitativ mit Hilfe der PGK-PCR eingestellt. In Abb. 24 A ist die PGK-Analyse und in Abb. 24 B die TNFR1-Analyse dargestellt. Die TNFR1-mRNA wird von Epidermalzellen bei allen Entnahmezeitpunkten sowie bei der Kontrollgruppe, die nicht mit DNFB in Kontakt kam, exprimiert (Abb. 24 B). Die mRNA-Menge ist 2 h und 4 h nach DNFB-Applikation etwa gleich stark, nach 6 h verringert sie sich, und nach 8 h ist sie am stärksten.

Zusammengefaßt konnte in den anfänglichen Experimenten gezeigt werden, daß die verwendeten Primerpaare in der Lage waren, die TNFR1- bzw. 2 -mRNA bei CTTL-Zellen zu amplifizieren. Weiterhin exprimierten frisch isolierte und kultivierte Epidermalzellen sowohl den TNFR1 als auch den TNFR2. Frisch isolierte und mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereicherte Langerhans-Zellen wiesen mRNA für die Expression von TNFR1 ebenso wie kultivierte mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereicherte Langerhans-Zellen auf. Frisch isolierte Langerhans-Zell-depletierte Zellsuspensionen exprimierten mRNA für den TNFR1. Die Expression von TNFR2-mRNA bei frisch isolierten oder kultivierten und mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereicherten Langerhans-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Bei der Expression der TNF-Rezeptoren nach DNFB-Applikation wiesen Epidermalzellen quantitative Unterschiede auf. Der TNFR2 konnte nur während der ersten 2 bis 4 h nachgewiesen werden, während der TNFR1 durchgehend in verschiedenen Mengen gebildet wurde.

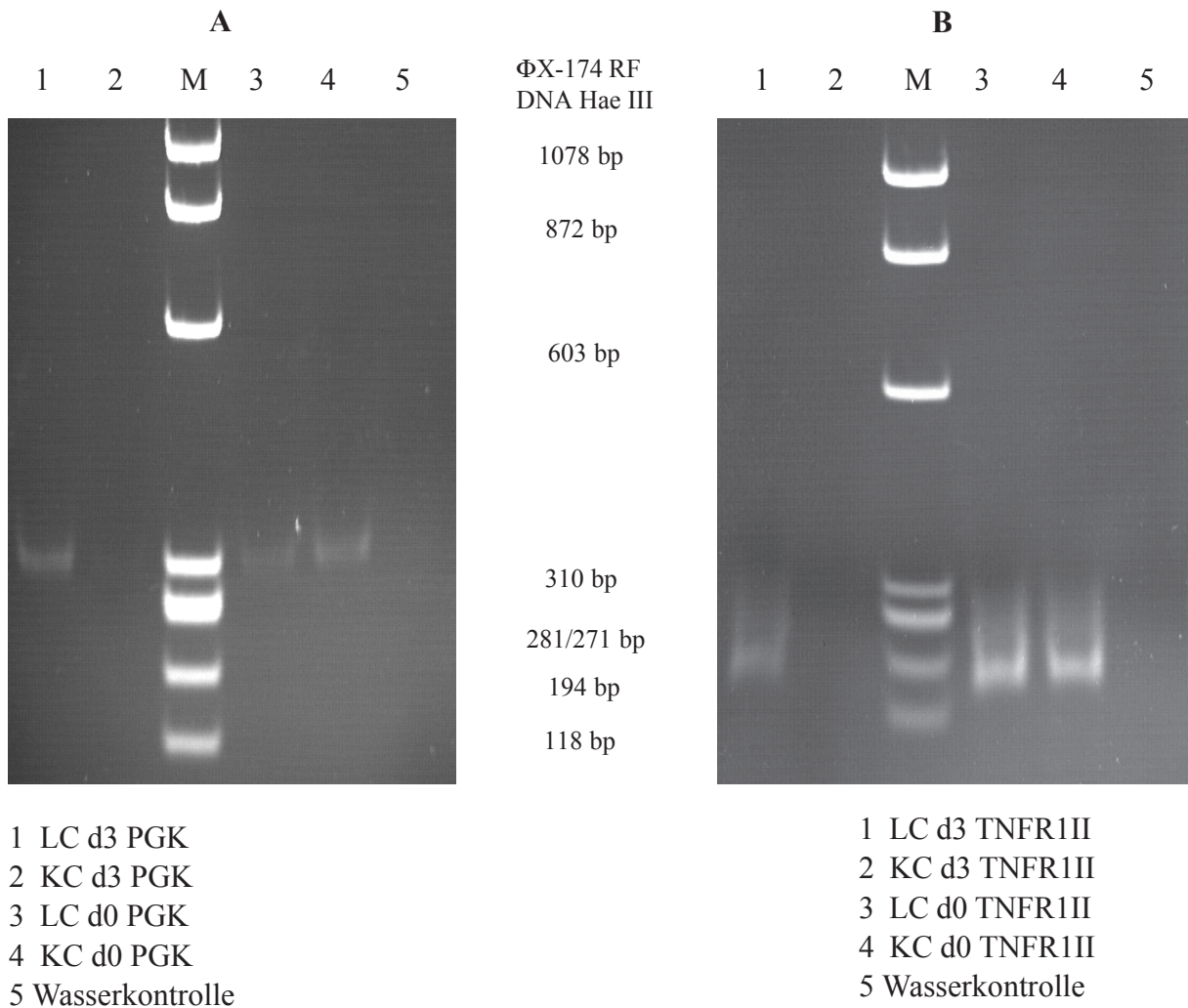
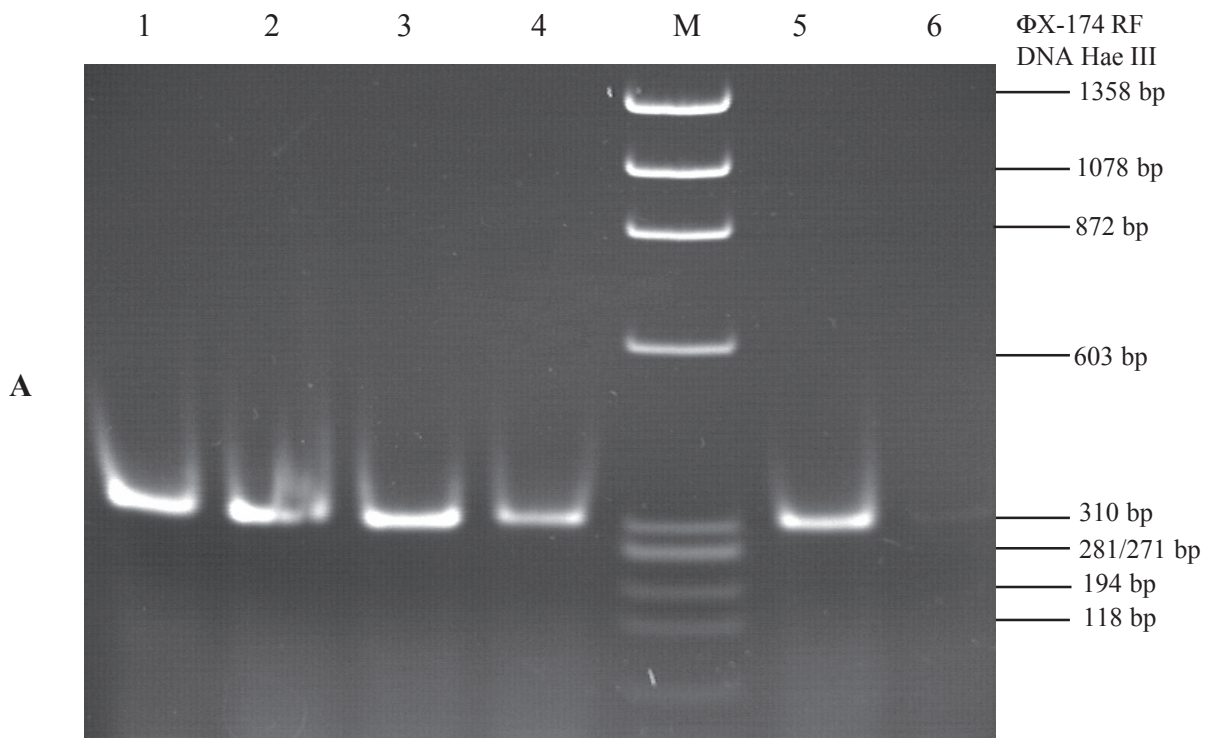


Abb. 23 RT-PCR mit TNFR1 bei frisch isolierten und kultivierten Langerhans-Zellen sowie Langerhans-depletierten epidermalen Zellen

Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA von frisch isolierten Langerhans-Zellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Die Langerhans-Zellen wurden mit Hilfe von paramagnetischen Beads angereinigt. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 μ l Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurde 1 μ l für die R.T.-Reaktion verwendet. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 μ l Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 μ l entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt.

Die Expression des TNFR1 wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 35 Zyklen bei 56°C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C). Die Analyse der PGK wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 30 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Für den Nachweis des TNFR1 wurde das Primerpaar II verwendet und eine cDNA-Menge entsprechend der PGK-Intensität eingesetzt. In Abb.23 A ist die PGK-Analyse und in Abb.23 B die TNFR1-Analyse von frisch isolierten und kultivierten Langerhans-Zellen sowie Keratinozyten dargestellt.



- 1 EC d0 8h nach DNFB
- 2 EC d0 6h nach DNFB
- 3 EC d0 4h nach DNFB
- 4 EC d0 2h nach DNFB
- 5 Kontrolle (ohne DNFB)
- 6 Wasserkontrolle

Abb. 24 A RT-PCR mit PGK bei frisch isolierten Langerhans-Zellen nach der Applikation von DNFB

Die BALB/C-Mäuse wurden nach Sensibilisierung mit 0,5% DNFB in Azeton/Olivenöl (1:1) an den Tagen 0 und 1 am Abdomen behandelt, und am Tag 4 wurde 0,2% DNFB auf die Ohren appliziert. Nach 2 h, 4 h, 6 h und 8 h wurden diese entnommen und die Epidermalzellen präpariert. Die TNF-Rezeptoren wurden durch Isolierung der mRNA der Zellen mit anschließender reverser Transkription und PCR-Technik nachgewiesen. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen mit 400 μ l Extraktionspuffer des mRNA-Purification-Kits versetzt und die lysierten Zellen in Eppendorf-Caps überführt. Nach der Zentrifugierung wurde der Ansatz, wie bereits im Methodenteil ausgeführt, bearbeitet. Nach der Gewinnung der mRNA wurde diese in 4 μ l DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurde 1 μ l für die R.T.-Reaktion verwendet. Die dadurch erhaltene cDNA wurde auf 20 μ l Volumen verdünnt. Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 μ l entnommen. Die PCR-Reaktionen wurden gemäß Methodenteil 2.2.4 durchgeführt. Die Analyse der PGK wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 30 Zyklen bei 56°C Annealing-Temperatur durchgeführt. In Abb.24 A ist die PGK-Analyse und in Abb.24 B die Untersuchungen zur Expression der TNFR1-mRNA dargestellt.

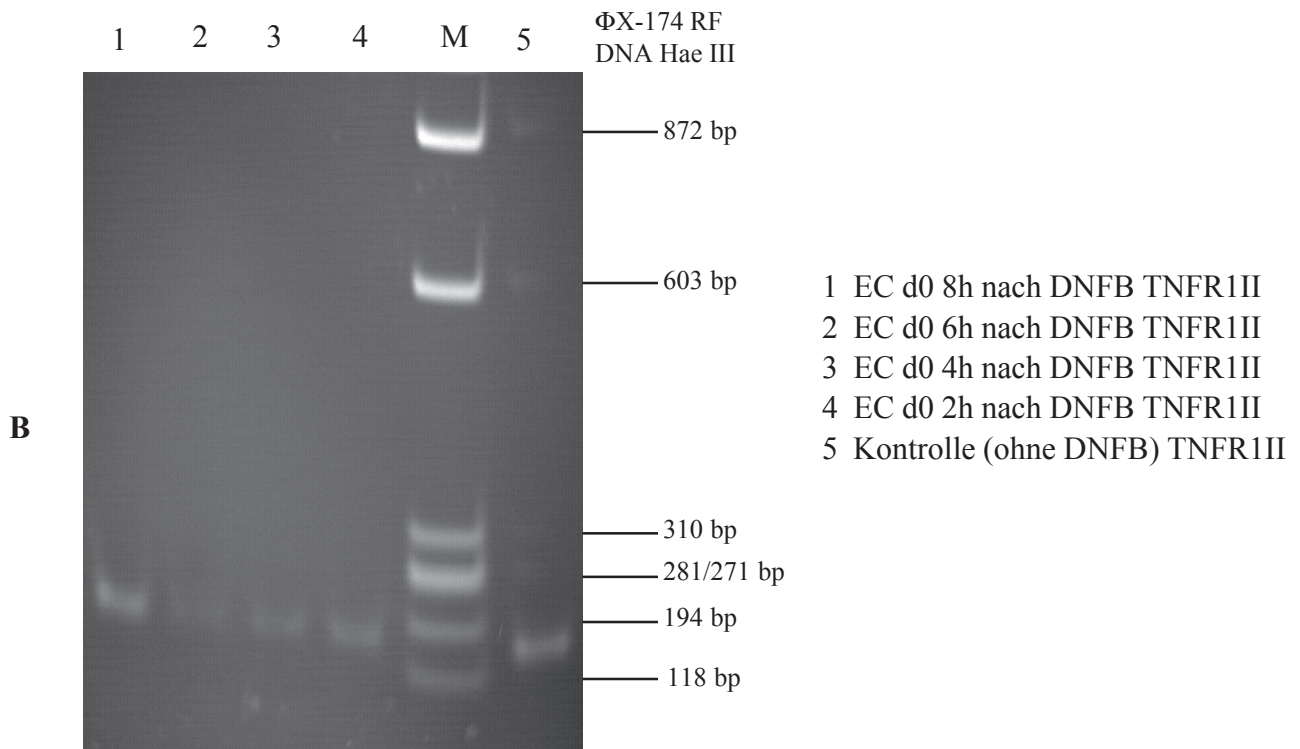


Abb. 24 B RT-PCR mit TNFR1 bei frisch isolierten Langerhans-Zellen nach der Applikation von DNFB

Die Expression der TNFR1- mRNA wurde mit 1 Zyklus bei 59°C, 2 Zyklen bei 58°C, 2 Zyklen bei 57°C und 35 Zyklen bei 56 °C untersucht (1 Zyklus: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei angegebener Annealing-Temperatur und 1 Minute bei 72°C). Für den Nachweis des TNF-Rezeptor 1 wurde das Primerpaar II verwendet und eine cDNA-Menge entsprechend ihrer PGK-Intensität eingesetzt.

Teil 2: Wirkung von Leflunomid auf die Kontaktallergie

LF als immunmodulierende Droge mit seinen immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Wirkungen wurde bereits bei DTH-Reaktionen wie adjuvanter Arthritis getestet. Sowohl eine DTH-Reaktion als auch eine Kontaktallergie werden der Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV zugeordnet. In neuerer Zeit häufen sich jedoch experimentelle Hinweise, daß die Kontaktallergie und die DTH gegen Proteinantigene auf unterschiedlichen Pathomechanismen beruhen. DTH-Reaktionen scheinen von Th1-Zellen bestimmt zu werden. IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellen scheinen dagegen bei kontaktallergischen Reaktionen die Effektorzellen zu sein, während IL-4/IL-10-produzierende CD4⁺-Zellen gegenregulatorische Funktionen erfüllen. In vielen Fällen muß mit Corticosteroiden behandelt werden. Aufgrund der schweren Nebenwirkungen wird nach günstigeren Behandlungskonzepten gesucht. Aus diesem Grund wurde im murinen Modellsystem die Wirkung von Leflunomid auf eine kontaktallergische Reaktion untersucht.

1 Wirkung von oral appliziertem LF auf den Verlauf einer CHS gegen DNFB

In einem ersten Experiment wurde die mögliche anti-inflammatorische Wirkung von LF auf eine CHS untersucht. Dazu wurden Mäusen zwei verschiedene Konzentrationen von LF oral appliziert. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe 1% CMC verabreicht, während eine weitere Gruppe dagegen unbehandelt blieb. Nach der Sensibilisierung aller Gruppen mit DNFB wurde dann durch Auftragen von DNFB auf das jeweils rechte Ohr der Tiere die Kontaktallergie ausgelöst. Die resultierenden Ohrschwellungen wurden gemessen und in Abb. 25 grafisch dargestellt.

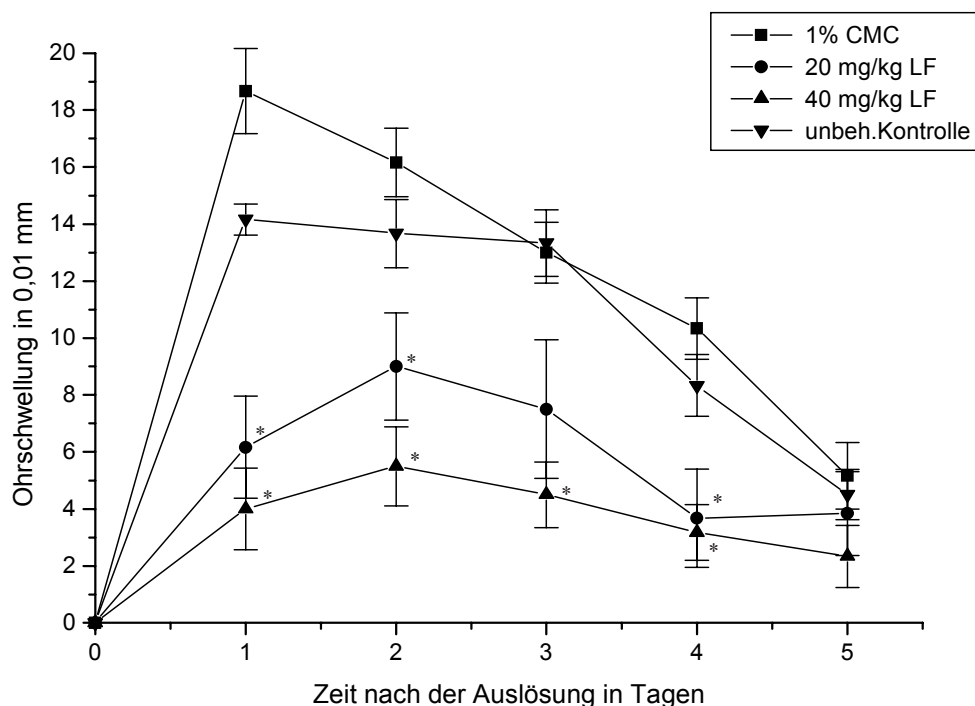


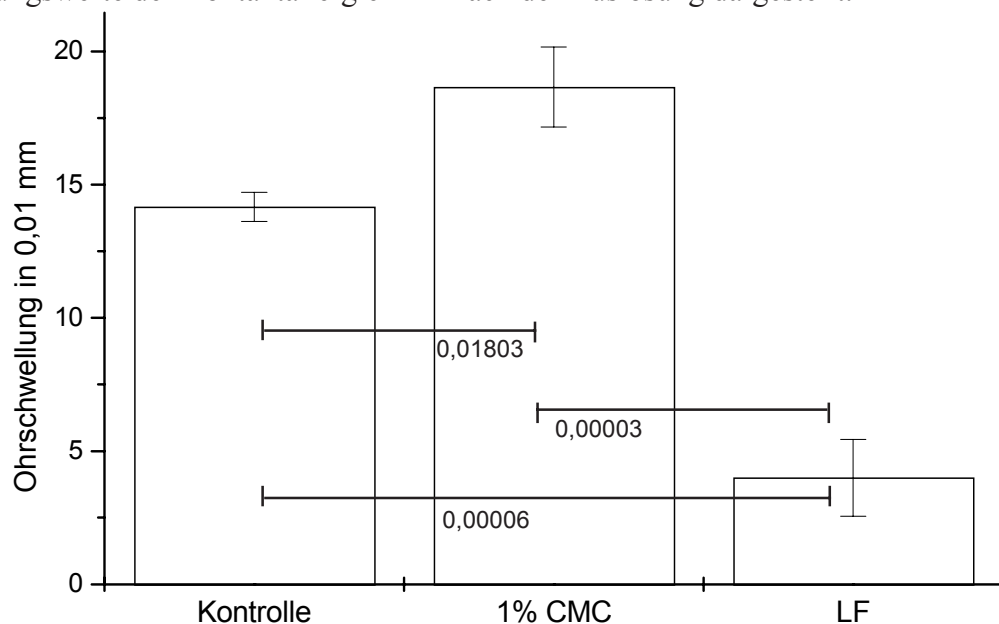
Abb. 25 Wirkung von oral appliziertem Leflunomid auf den Verlauf einer CHS

Bei diesem Experiment wurden vier Versuchsgruppen von je 6 BALB/c-Mäusen getestet, indem 2 verschiedene Konzentrationen von LF (20 mg/kg und 40 mg/kg), gelöst in 1% Carboxymethylcellulose (CMC), den Mäusen oral verabreicht wurde. Am Tag -1 erfolgte die Applikation von LF, und dieser Vorgang wurde alle 24 h bis zur Auslösung der Kontaktallergie wiederholt. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe 1% CMC oral verabreicht, während eine weitere Gruppe dagegen unbehandelt blieb.

Die Auslösung der Kontaktallergie erfolgte bei allen Gruppen durch Auftragen von jeweils 17 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl-Gemisch) auf das Abdomen an den Tagen 0 und 1. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie durch Auftragen von 7,5 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl) auf das jeweils rechte Ohr der Tiere. Nach der Auslösung wurde die Ohrschwellung alle 24 h gemessen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die Gruppe "unbeh.Kontrolle", die nur mit DNFB behandelt worden war, zeigte eine Ohrschwellungsreaktion, die ihr Maximum am Tag 1 bei 14 Skaleneinheiten hatte. Danach fiel die Schwellung bis auf 5 Skaleneinheiten am Tag 5 ab. Ein ähnlicher Verlauf war bei der Gruppe mit 1%iger CMC-Gabe zu beobachten. Eine deutlich geringere Schwellung war bei der Gruppe, die 20 mg/kg LF erhielt, zu sehen. Die Gruppe, die 40 mg/kg LF erhalten hatte, zeigte eine noch geringere Schwellungsreaktion. Aus dem zeitlichen Verlauf der Schwellungsreaktion war eine Wirkung von LF klar zu erkennen. Mit steigender Konzentration von LF wurde die Schwellungsreaktion stärker inhibiert. Offenbar wirkte LF bei der Sensibilisierungsphase Kontaktallergie-verhindernd.

Zur statistischen Absicherung der gewonnenen Daten wurden die Schwellungswerte mit dem Student t-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. In Abb. 26 sind stellvertretend die Schwellungswerte der Kontaktallergie 24 h nach der Auslösung dargestellt.

**Abb. 26** Vergleich der Mittelwerte der Schwellungen von Leflunomid-behandelten, kontaktallergischen Mäusen mit denen von Kontrollgruppen

Bei dieser Abbildung wurden die Schwellungswerte des Versuchs, der in Abb. 25 dargestellt ist, verwendet. Die Mäuse wurden an den Tagen 0 und 1 mit je 17 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl-Gemisch) auf dem Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie durch Auftragen von 7,5 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl) auf das jeweils rechte Ohr der Tiere. 24 h nach der Auslösung wurde die Ohrschwellung gemessen. Einer Gruppe wurden alle 24 h, beginnend am Tag -1, oral 40 mg/kg Leflunomid appliziert, und eine weitere Gruppe bekam eine 1%ige Carboxymethylcellulose oral appliziert. Die Kontrollgruppe wurde nicht oral behandelt. Bei der statistischen Auswertung kam der unabhängige t-Test zur Anwendung. Die eingezeichneten Linien stellen die p-Werte untereinander grafisch dar.

Aus der Grafik ist ersichtlich, daß LF inhibitorisch auf eine Schwellungsreaktion, wie sie von einer Kontaktallergie ausgelöst wird, wirkt. Es ist eine deutlich abgeschwächte Schwellung durch LF-Gabe zu erzielen. Die Kontrollgruppe, mit 1% CMC behandelt, zeigte einen signifikant unterschiedlichen Wert gegenüber der mit 40 mg/kg LF behandelten Gruppe. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte einen statistisch signifikant unterschiedlichen Schwellungswert zur Leflunomidgruppe und einen ähnlichen Wert zu der Gruppe, der 1% CMC oral appliziert wurde.

2 Wirkungszeitraum der Inhibition

Zur Untersuchung des Zeitraums der inhibitorischen Wirkung von LF, wie sie im vorherigen Versuch beobachtet werden konnte, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Zwei Gruppen von Mäusen wurden mit 40 mg/kg LF oral behandelt. Während einer Gruppe 1% CMC verabreicht wurde, blieb eine weitere Gruppe dagegen unbehandelt. Die orale Behandlung erfolgte am Tag -1 und wurde alle 24 h bis Tag 4 wiederholt. Am Tag 0 und 1 wurden alle Gruppen bis auf eine mit LF behandelte Gruppe mit DNFB sensibilisiert. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Allergie. Die Ohrschwellungswerte der Tiere wurden in Abb. 27 A grafisch dargestellt.

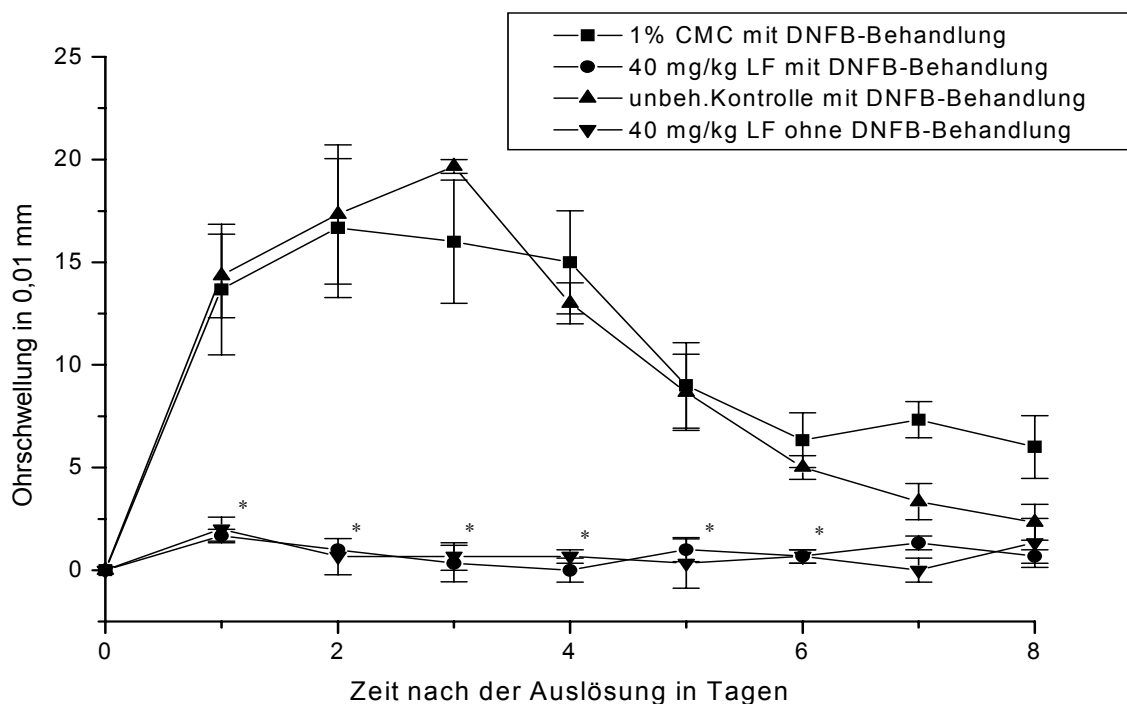


Abb. 27A Wirkung von oral appliziertem Leflunomid auf den Verlauf einer CHS

Bei diesem Versuch wurden 4 Gruppen von je 3 Mäusen getestet. Die Mäuse wurden an den Tagen 0 und 1 mit je 25 μ l 0,5% DNFB (Aceton/Olivenöl 4:1) am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Einer Gruppe wurden alle 24 h, beginnend am Tag -1, 40 mg/kg Leflunomid oral appliziert, während einer weiteren Gruppe eine 1%ige Carboxymethylcelluloselösung (CMC) als Kontrolle oral appliziert wurde. Zwecks zusätzlicher Kontrolle wurde eine Gruppe ohne DNFB-Behandlung nur mit 40 mg/kg LF gefüttert. Die LF-Gabe begann am Tag -1, also einen Tag vor Sensibilisierung des Abdomens mit 0,5% DNFB. Sie wurde kontinuierlich alle 24 h bis zum Tag 6 verabreicht und dann eingestellt. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Sowohl die mit 1% CMC behandelte als auch die unbehandelte Kontrollgruppe zeigten hohe Schwellungsreaktionen. Am Tag 2 erreichten die Schwellungswerte der Gruppe, die mit 1% CMC behandelt wurde und am Tag 3 die Werte der Kontrollgruppe ihr Maximum. Die Gruppe, die LF in der Konzentration von 40 mg/kg erhielt, zeigte zusammen mit der Kontrollgruppe, die nur LF ohne DNFB-Behandlung bekam, eine geringe Schwellungsreaktion von 2 Skaleneinheiten am Tag 1, die danach sofort auf den Normalwert abfiel. In diesem Experiment konnte deutlich die allergieverhindernde Wirkung von LF bestätigt werden.

Zwei Wochen nach der ersten Konfrontation der Tiere mit dem Kontaktallergen wurden die Mäuse noch einmal mit DNFB in Kontakt gebracht, indem DNFB auf das jeweils rechte Ohr der Tiere aufgebracht wurde. Die Ohrschwellungen sind in Abb. 27 B grafisch dargestellt.

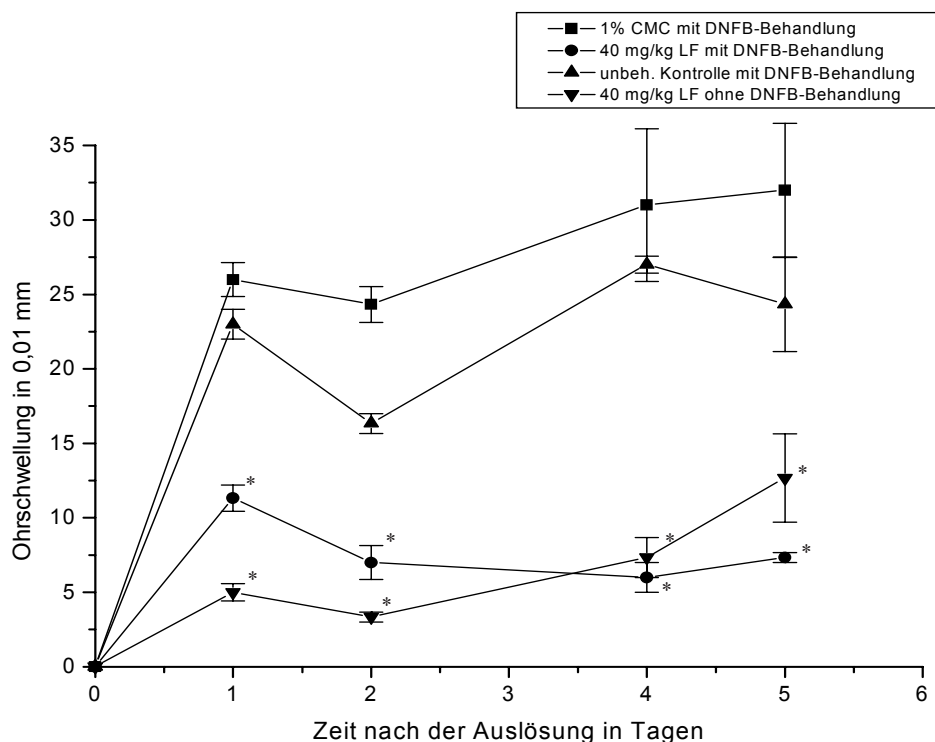


Abb. 27B Zweite Auslösung der Kontaktallergie bei den Tieren

Zwei Wochen nach dem ersten Kontakt mit DNFB gem. Abb. 27A wurden dieselben Tiere noch einmal mit $10 \mu\text{l}$ 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr konfrontiert. Nach 24 h wurde die Ohrschwellung der Tiere registriert. Die Gruppe "40 mg/kg LF" hatte im Gegensatz zu den drei anderen Gruppen vorher noch keinen Kontakt mit DNFB. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die unbehandelte Kontrollgruppe sowie die mit 1% CMC behandelte Gruppe zeigten in diesem Versuch am Tag 1 bereits hohe Schwellungswerte. Die Steigerung der Schwellung am Tag 4 bei beiden Gruppen ist auf eine Nekrotisierung an den Außenrändern der Ohren zurückzuführen. Die Gruppe, die 40 mg/kg LF erhielt, zeigte am Tag 1 eine Inhibition der Schwellungsreaktion. Die Schwellungsreaktion ist bei dieser Gruppe etwas stärker als bei der Kontrollgruppe, die nur LF ohne vorherige DNFB-Behandlung erhielt. Die Kontrollgruppe, die zuvor noch keinen Kontakt mit DNFB hatte, aber im vorherigen Experiment mit LF

Einen erneuten Kontakt mit dem Kontaktallergen DNFB auf den jeweils rechten Ohren erfuhren die Tiere 31 Tage später. In Abb. 29 C sind die Ohrschwellungswerte grafisch dargestellt. Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen setzte die Schwellungsreaktion mit 24 h Verspätung ein. Wie in Abb. 29 B wiesen die Gruppe, die 1% CMC erhielt und die Kontrollgruppe die höchsten Schwellungswerte auf. Der Schwellungsverlauf war nahezu identisch. Die LF-Gruppe, der LF ohne gleichzeitige DNFB-Behandlung appliziert wurde (Abb. 29 A) und die mit DNFB erst später in Kontakt kam (Abb. 29 B), zeigte hier höhere Schwellungswerte als die Gruppe, die LF während der Sensibilisierungsphase erhielt. Offenbar führte die DNFB-Applikation während der ersten Auslösung der Kontaktallergie (Abb. 29 B) zu sensibilisierten T-Zellen, die aber dann in geringerer Anzahl als bei den ersten beiden Gruppen vorlagen. Dies könnte der geringeren Menge und Konzentration der DNFB-Applikation zuzuschreiben sein.

In Abb. 29 D ist das Resultat eines weiteren Kontaktes der Tiere mit DNFB grafisch dargestellt. Bei dieser vierten Auslösung der Kontaktallergie wurden wie vorher 10µl 0,2% DNFB auf das jeweils rechte Ohr der Tiere gegeben. Die mit 1% CMC behandelte Gruppe sowie die Kontrollgruppe und die Gruppe, die während des ersten Versuchs nur LF erhalten hatte, wiesen einen nahezu gleichen Verlauf der Ohrschwellungen auf. Erheblich geringere Schwellungswerte wies dagegen die Gruppe auf, die während der Sensibilisierungsphase bzw. während des ersten Kontaktes mit DNFB (Abb. 29 A) 40 mg/kg LF erhalten hatte. Die Schwellungsreaktion der LF-Gruppe bewegte sich bis zum Tag 5 auf dem fast gleichen Niveau von 10 Skaleneinheiten ähnlich den Versuchen in Abb. 29 B und 29 C. Es ist erstaunlich, daß trotz dieses langen Zeitraumes die inhibitorische Wirkung von LF auf T-Zellen offenbar immer noch festzustellen war. Die jetzt fast identische Schwellungsreaktion der zweiten Kontrollgruppe mit der Gruppe, die 1% CMC erhielt und der ersten Kontrollgruppe läßt sich auf den wiederholten Kontakt mit DNFB zurückführen. Wenn bei der vorherigen Auslösung mit DNFB vielleicht nur einige T-Zellen sensibilisiert worden waren, so sind bei der vierten Kontaktallergieauslösung bei den Tieren ähnliche Zahlen zu vermuten wie bei den erstgenannten Gruppen.

Festzuhalten ist ein inhibitorischer Effekt von LF bei der Schwellungsreaktion, der auch nach insgesamt 119 Tagen noch zu beobachten war, obwohl bei der wiederholten Auslösung der Kontaktallergie wieder neue T-Zellen von DNFB sensibilisiert worden waren, was ja bei der Kontrollgruppe konstatiert wurde. Trotzdem scheinen sich diese *de novo* sensibilisierten T-Zellen bei der LF-Gruppe nicht auf die Schwellungsreaktion ausgewirkt zu haben, bzw. sie wurden vielleicht supprimiert.

Zusammenfassend läßt sich bei diesen Experimenten feststellen, daß LF inhibierend auf die Sensibilisierung von T-Zellen wirkt. Insgesamt läßt sich durch zwei Langzeitversuche (ein repräsentatives Experiment ist dargestellt) die Beobachtung bestätigen, daß die supprimierende Wirkung von LF bei der Kontaktallergie auch noch nach langer Zeit zu beobachten ist.

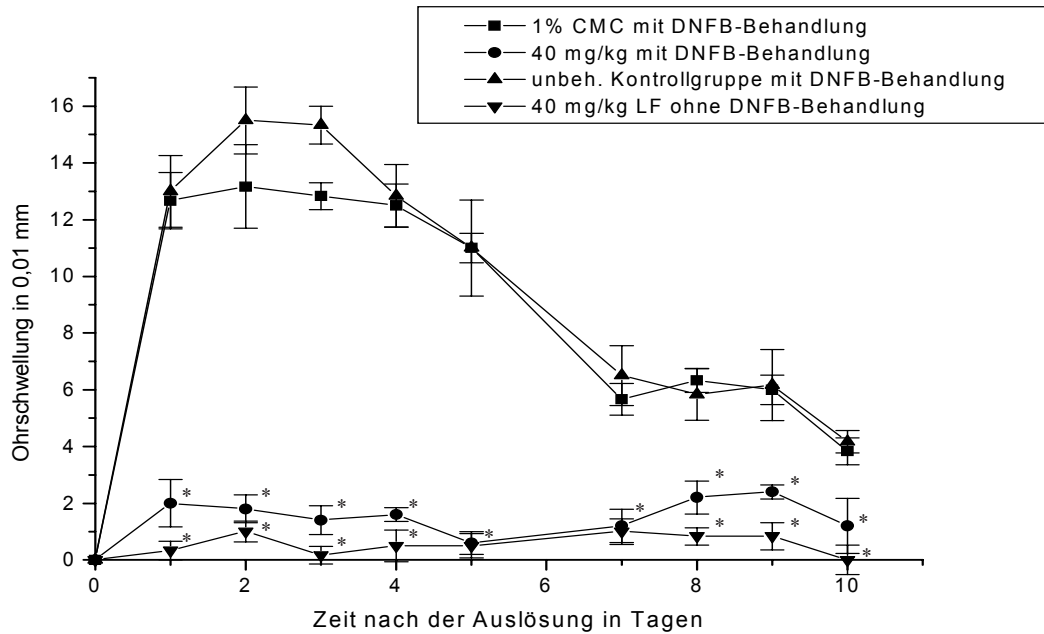


Abb. 29A Kinetik der Schwellungsreaktion bei LF-Gabe

Bei diesem Versuch wurden die Mäuse in vier Gruppen à 6 Tieren eingeteilt. Die Kontaktallergie wurde, wie vorher in Abb. 28 angegeben, durch DNFB ausgelöst. Während eine Gruppe 40 mg/kg LF erhielt, wurde die Kontrollgruppe nur der CHS-auslösenden Behandlung unterzogen. Die dritte Gruppe wurde in diesem Experiment lediglich mit 40 mg/kg LF gefüttert, kam jedoch mit DNFB nicht in Kontakt. Die letzte Gruppe erhielt während des Experiments 1% CMC und wurde mit DNFB behandelt. Die LF-Gabe und die CMC-Gabe begannen am Tag -1 und wurden kontinuierlich alle 24 h bis Tag 5 wiederholt. Die Messung der Ohrschwellung begann am Tag 6. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

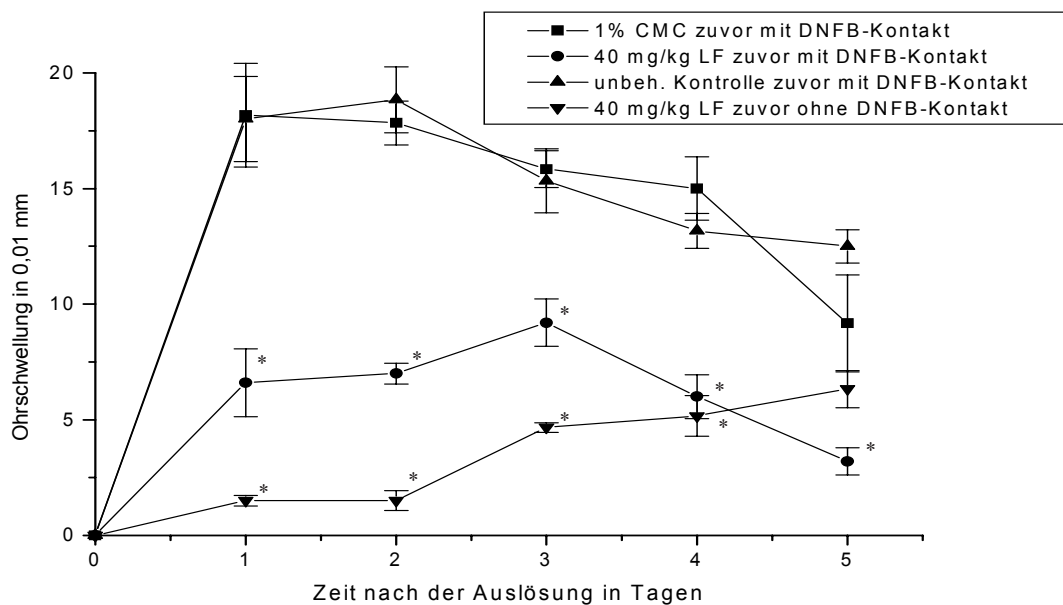


Abb. 29B Zweite Auslösung der Kontaktallergie bei den Tieren gemäß Abb. 28

14 Tage nach dem Experiment gem. Abb. 28 wurde das jeweils rechte Ohr der betreffenden Tiere noch einmal mit 10 μ l 0,2% DNFB konfrontiert und 24 h später die daraus resultierende Ohrschwellung gemessen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

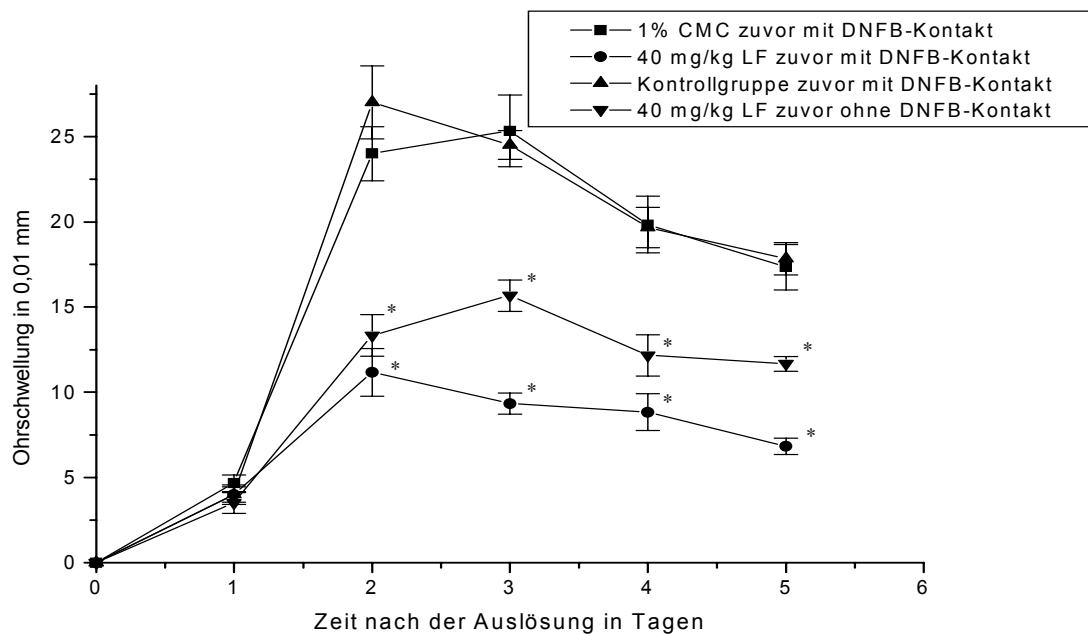


Abb. 29C Dritte Auslösung der Kontaktallergie bei den Tieren gemäß Abb. 28

Die betreffenden Tiere wurden erneut mit $10\mu\text{l}$ 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr behandelt. Auch hier wurden 24 h nach der Applikation die Ohrschwellungswerte ermittelt und grafisch dargestellt. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

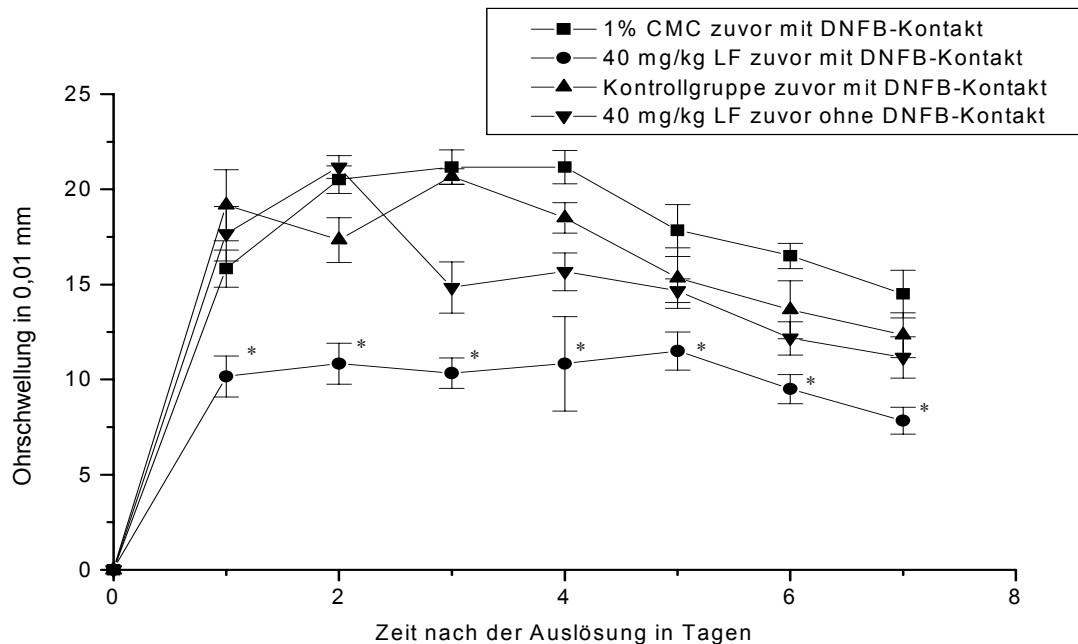


Abb. 29D Vierte Auslösung der Kontaktallergie bei den Tieren gemäß Abb. 28

Dieselben Mäuse wurden zum viertenmal mit dem Kontaktallergen DNFB behandelt. Sie wurden am Tag 3 mit $10\mu\text{l}$ 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr behandelt. Die hervorgerufene Ohrschwellung wurde 24 h später gemessen und aufgezeichnet. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

3 Inhibitorische Wirkung von LF auf eine allergische Reaktion gegen Oxazolon

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob die bis jetzt nach DNFB-Behandlung festgestellte Wirkung von LF auch auf andere Kontaktallergene, z.B. Oxazolon (4-Ethoxy-methyl-2-phenyl-2-Oxazolon) zu übertragen ist. In diesem Versuchsansatz wurde der inhibitorische Effekt von LF bei einer Oxazolon-induzierten Schwellungsreaktion untersucht. Hierbei wurden drei Gruppen von Mäusen mit 10, 20 bzw. 40 mg/kg LF oral behandelt. Einer Gruppe wurde 1% CMC oral appliziert. Bei allen Gruppen begann die Applikation am Tag -1 und wurde bis Tag 4 alle 24 h wiederholt. Die Tiere wurden am Tag 1 mit Oxazolon sensibilisiert. Am Tag 4 wurde auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere die Kontaktallergie ausgelöst. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 30 dargestellt.

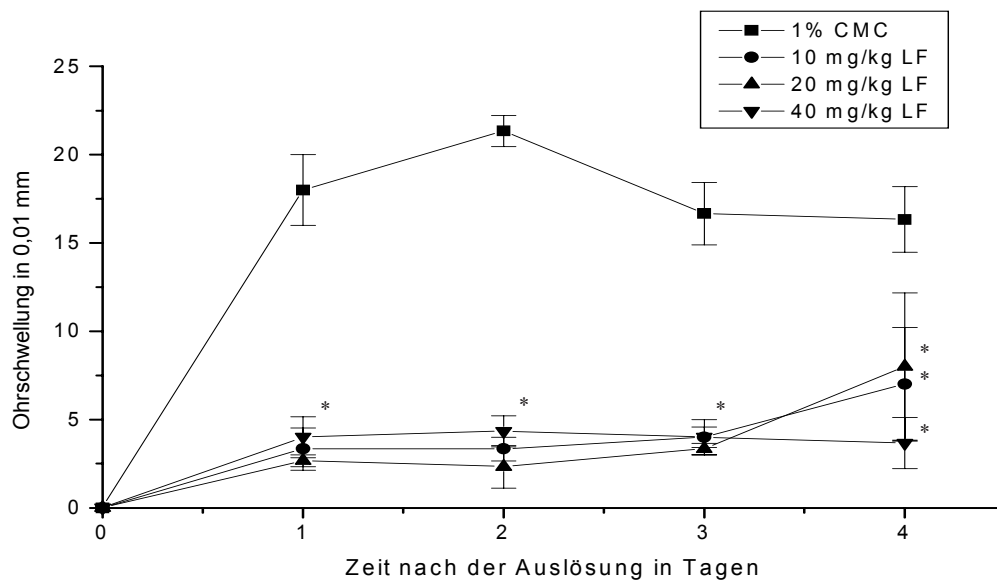


Abb. 30 Wirkung von Leflunomid auf den Verlauf einer Oxazolon-induzierten CHS

Bei diesem Versuch wurden die Mäuse in 4 Gruppen à 3 Tieren getestet. Sie wurden am Tag 1 mit 25 µl 750 µg/ml Oxazolon am Abdomen sensibilisiert und am Tag 4 mit 10 µl 30 µg/ml Oxazolon auf jeder Seite des jeweils rechten Ohres behandelt. Die erste Gruppe erhielt zur Kontrolle 1% CMC, und den drei anderen Gruppen wurden 10, 20 und 40 mg/kg LF oral appliziert. Bei allen Gruppen begann die Fütterung am Tag -1 und wurde bis Tag 4 alle 24 h wiederholt. 24 h nach der Auslösung wurde die Ohrschwellung gemessen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die mit 1% CMC gefütterte Kontrollgruppe zeigte am Tag 1 bereits eine Schwellungsreaktion, die am Tag 2 ihren Höhepunkt erreichte. Die Gruppen, denen LF in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurde, zeigten eine geringere Schwellung mit nahezu gleichbleibenden Werten. Die Schwellungswerte der LF-behandelten Gruppen wiesen in der Anfangsphase keine Unterschiede auf, lediglich am Tag 4 nahm die Ohrschwellung der mit 10 und 20 mg/kg LF gefütterten Gruppen geringfügig zu. Die Gruppe, die 40 mg/kg LF erhielt, blieb auf gleichem niedrigem Niveau.

Insgesamt betrachtet, kann der inhibitorische Effekt von LF bei einer Kontaktallergie bei zwei verschiedenen Kontaktallergenen beobachtet werden. Er scheint nicht auf eine Stoffklasse beschränkt zu sein, da die Entstehung von Kontaktallergien, ausgelöst durch DNFB und Oxazolon, verhindert wird. Schon mit einer LF-Konzentration von 10 mg/kg kann eine durch Oxazolon ausgelöste Schwellungsreaktion verhindert werden, was auf eine effektivere Inhibition im Vergleich zu einer Schwellungsreaktion, die von DNFB ausgelöst wird,

schließen läßt. Dies weist auch auf einen anderen Wirkungsmechanismus von Oxazolon hin, wie auch aus der Literatur zu entnehmen ist (194).

4 Wirkung von LF auf eine inflammatorische bzw. irritative Reaktion

Im nachfolgenden Versuch soll nun geklärt werden, ob LF nicht nur eine durch ein Kontaktallergen induzierte Schwellung inhibieren kann, sondern auch eine Schwellungsreaktion, die durch ein Irritans hervorgerufen wird. Für die irritative Schwellung wurde Oxazolon in einer hohen Konzentration ohne vorherige Sensibilisierung verwendet. Einer Gruppe wurde vor Kontakt mit Oxazolon bereits Leflunomid gegeben. Sie wurde vom Tag -1 bis Tag 4 alle 24 h mit 40mg/kg LF behandelt. Zur Kontrolle wurde einer weiteren Gruppe 1% CMC oral appliziert. Die Schwellungsreaktion wurde am Tag 0 mit 10 µl 50 mg/ml Oxazolon auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere ausgelöst. Die Messung der Ohrschwellungen ist grafisch in Abb. 31 aufgezeichnet.

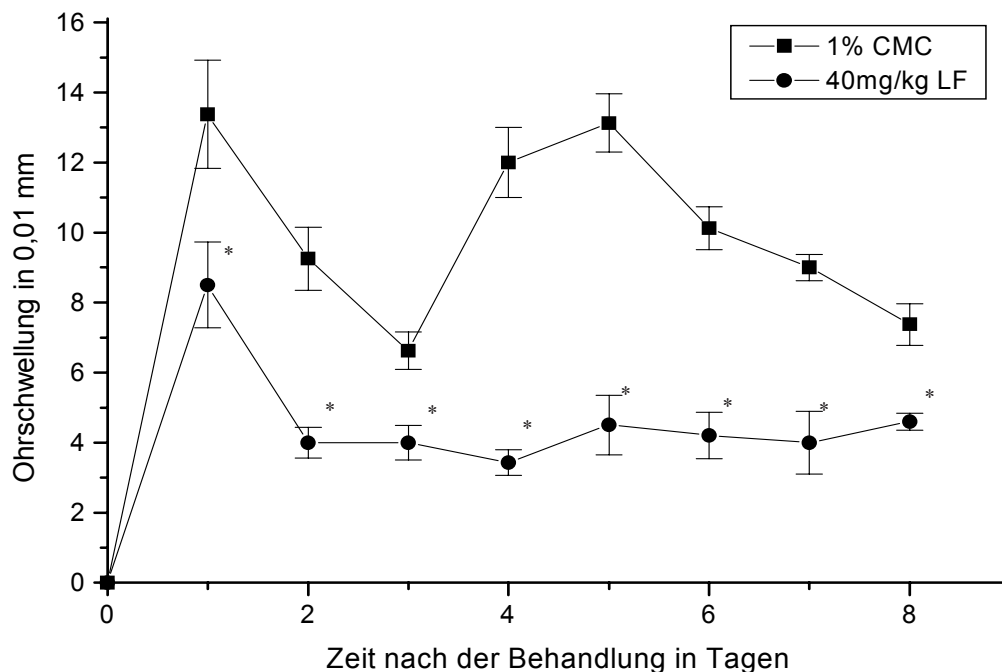


Abb. 31 Ohrschwellungsreaktion Oxazolon-behandelter Tiere ohne vorherige Sensibilisierung

Bei diesem Versuch wurden je Gruppe 8 BALB/c Mäuse am Tag 0 mit 10 µl 50 mg/ml Oxazolon in Aceton/Olivenöl auf jeder Seite des rechten Ohres behandelt. Die Tiere bekamen vom Tag -1 bis Tag 4 alle 24 h 40 mg/kg LF oral appliziert. Die Schwellungsreaktion wurde von Tag 1 an gemessen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die Schwellungsreaktion setzte bereits nach 24 h ein und erreichte zu diesem Zeitpunkt sowohl bei der Kontroll- als auch bei der LF-Gruppe einen maximalen Wert, und zwar 13 Skaleneinheiten bei der Kontroll- und 8 Skaleneinheiten bei der LF-Gruppe. An den Tagen 2 und 3 fiel die Ohrschwellung der Kontrollgruppe auf 7 Skaleneinheiten zurück und stieg an den Tagen 4 und 5 an, um danach gleich wieder abzufallen. Die Ohrschwellungswerte der LF-Gruppe fielen nach Tag 1 auf 5 Skaleneinheiten zurück und blieben auf diesem Niveau bis zum Ende der Messung. Der zweite Anstieg der Schwellung am Tag 4 entfiel bei der LF-Gruppe. Somit konnte eine inhibitorische Wirkung von LF bei der irritativen Reaktion konstatiert werden. Insgesamt lagen die Werte der LF-Gruppe immer deutlich unter denen der Kontrollgruppe.

5 Antigenpezifität der Wirkung von LF

Es wurde durch eine Kombination von Kontaktallergenen untersucht, ob die inhibitorische Wirkung von LF antigen-spezifisch ist. In dem nachfolgend beschriebenen Versuch wurden jeweils zwei Gruppen von Mäusen mit 40 mg/kg LF bzw. 1% CMC oral behandelt. Die orale Applikation erfolgte alle 24 h an den Tagen -1 bis 4. Alle vier Gruppen wurden an den Tagen 0 und 1 mit DNFB sensibilisiert, und am Tag 4 wurde mit DNFB die Kontaktallergie ausgelöst. Ein zweiter Kontakt mit dem Kontaktallergen oder dem Irritans Oxazolone erfolgte am Tag 18 durch Auftragen auf das jeweils rechte Ohr der Tiere. In Abb. 32 ist der zeitliche Ablauf des Experiments grafisch dargestellt.

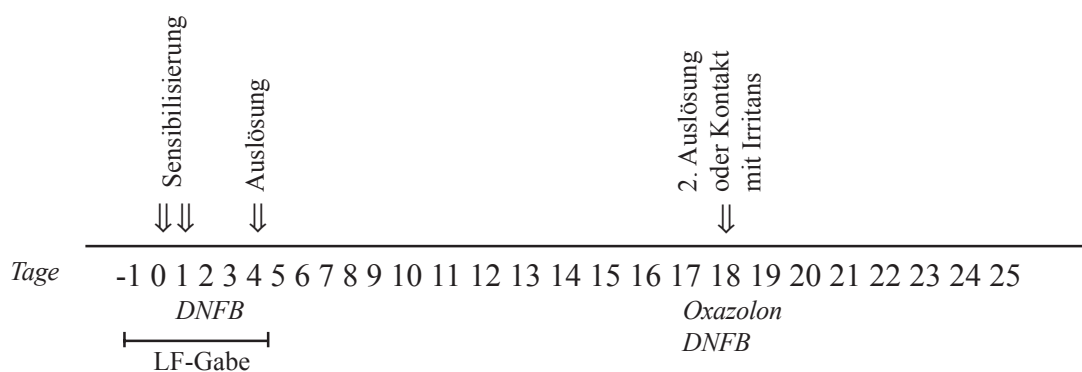


Abb. 32 Zeitlicher Verlauf des Experiments

An diesem Versuch nahmen 4 Gruppen mit je 6 BALB/c Mäusen teil. Jeweils zwei Gruppen erhielten LF bzw. 1% CMC zwecks Kontrolle an den Tagen -1 bis 4 eine orale Applikation von 40 mg/kg LF bzw. 1% CMC. Alle Gruppen wurden an den Tagen 0 und 1 mit DNFB sensibilisiert, und am Tag 4 wurde durch erneute Kontaktallergen-Gabe die Kontaktallergie ausgelöst. Am Tag 18 erfolgte dann eine zweite Auslösung mit demselben Kontaktallergen (DNFB) oder einem Irritans (Oxazolone). Die genaue Behandlung ist in Abb. 33 beschrieben.

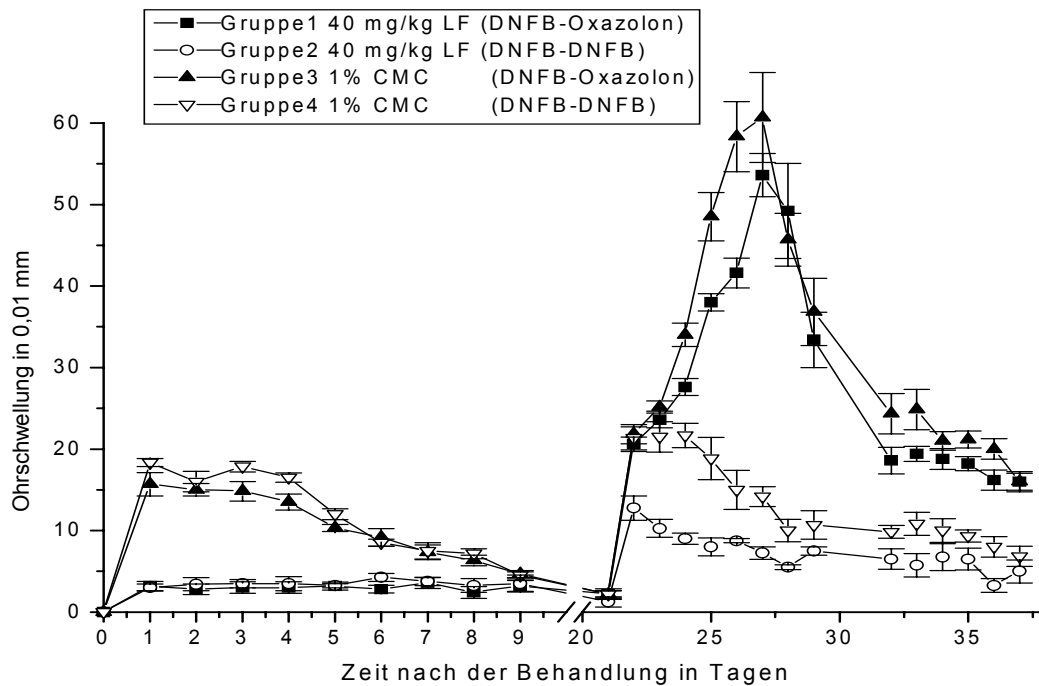


Abb. 33 Antigen-spezifität der Wirkung von LF

Aus Abb. 32 kann man den zeitlichen Verlauf dieses Experiments ersehen. Die Gruppen 1, 2, 3 und 4 wurden mit $25 \mu\text{l}$ 0,5% DNFB am Abdomen während der Sensibilisierungsphase behandelt. Die erste Auslösung der Kontaktallergie erfolgte mit $10 \mu\text{l}$ 0,2% DNFB auf jeder Seite des jeweils rechten Ohres der Tiere. Gruppe 1 erhielt während der Behandlung 40 mg/kg LF und wurde am Tag 18 mit $10 \mu\text{l}$ 50 mg/ml Oxazolone je rechter Ohrseite konfrontiert. Gruppe 2 erhielt wie Gruppe 1 während der Sensibilisierungsphase 40 mg/kg LF, wurde aber am Tag 18 mit $10 \mu\text{l}$ 0,4% DNFB je Ohrseite behandelt. Gruppe 3 erhielt während der Behandlung 1% CMC und wurde am Tag 18 mit $10 \mu\text{l}$ 50 mg/ml Oxazolone je rechter Ohrseite konfrontiert. Gruppe 4 erhielt wie Gruppe 3 während der Sensibilisierungsphase 1% CMC, wurde aber am Tag 18 mit $10 \mu\text{l}$ 0,4% DNFB je rechter Ohrseite behandelt. Anschließend erfolgte die Messung und grafische Aufzeichnung der Ohrschwellungen. Die gefüllten Symbole zeigen eine Oxazolone-Behandlung und die offenen Symbole eine DNFB-Behandlung am Tag 18 an.

Wie aus Abb. 33 zu ersehen ist, konnte man deutlich eine Schwellungsreaktion bei den Gruppen 3 und 4 im ersten Teil des Experiments konstatieren. Die Gruppen 1 und 2 erhielten während der Sensibilisierungsphase LF und zeigten eine geringe Schwellungsreaktion auf das Kontaktallergen DNFB. Dieser Verlauf bestätigte wiederum den inhibitorischen Einfluß von LF auf eine kontaktallergische Reaktion. Bei der Exposition des Ohrgewebes mit Oxazolone am Tag 18 war ein starker Anstieg der Ohrschwellungen bei den Gruppen 1 und 3 festzustellen. Die Schwellungswerte der beiden anderen Gruppen nach erneutem Kontakt mit DNFB waren im Vergleich zum ersten Teil des Versuchs etwas erhöht. Interessant war hierbei ein Vergleich der Gruppen 2 und 4. Die Gruppe 4, die mit 1% CMC gefüttert wurde, hatte hier deutlich höhere Werte als die mit LF gefütterte Gruppe 2, was wiederum für den langandauernden inhibitorischen Effekt von LF spricht. Der inhibitorische Effekt von LF auf die Ohrschwellungsreaktion nach Oxazolone-Gabe war dagegen wesentlich geringer. Der steile Anstieg der Schwellungsreaktion der mit Oxazolone behandelten Mäuse ist auf eine hohe irritative Konzentration zurückzuführen.

6 Wirkungszeitpunkt von LF bei der Sensibilisierungsreaktion

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Frage nach dem Wirkungszeitpunkt von LF während der Sensibilisierung. Um zu klären, ab welchem Zeitpunkt die inhibitorische Wirkung von LF einsetzt bzw. aufhört, wurde folgendes Experiment, wie in Abb. 34 und 35 gezeigt, durchgeführt. Es wurden zwei Gruppen von Mäusen mit 20 mg/kg oder 40 mg/kg LF oral behandelt. Als Kontrollgruppe wurde einer Gruppe 1% CMC oral appliziert. Alle Gruppen erhielten vom Tag 5 bis zum Ende des Versuchs alle 24 h die orale Applikation. Nach Sensibilisierung der Gruppen mit 17 μ l 0,4% DNFB an den Tagen 0 und 1 wurde am Tag 4 mit 7,5 μ l 0,4% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere die kontaktallergische Reaktion ausgelöst. Die Ohrschwellungswerte sind in Abb. 35 grafisch wiedergegeben.

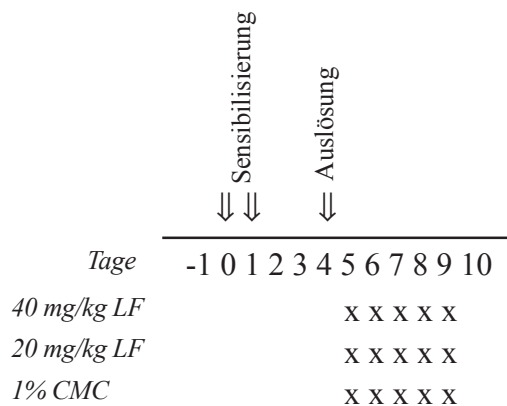


Abb. 34 Zeitschema der oralen Applikation von LF nach der Sensibilisierung mit DNFB

An diesem Versuch nahmen je Gruppe 6 BALB/c Mäuse teil. Die LF-Gruppen erhielten vom Tag 5 an bis zum Ende des Versuchs alle 24 h 40 mg/kg bzw. 20 mg/kg LF, während der CMC-Gruppe nur 1% CMC appliziert wurde. An den Tagen 0 und 1 wurden alle Gruppen mit 17 μ l 0,4% DNFB am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 7,5 μ l 0,4% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres der Tiere.

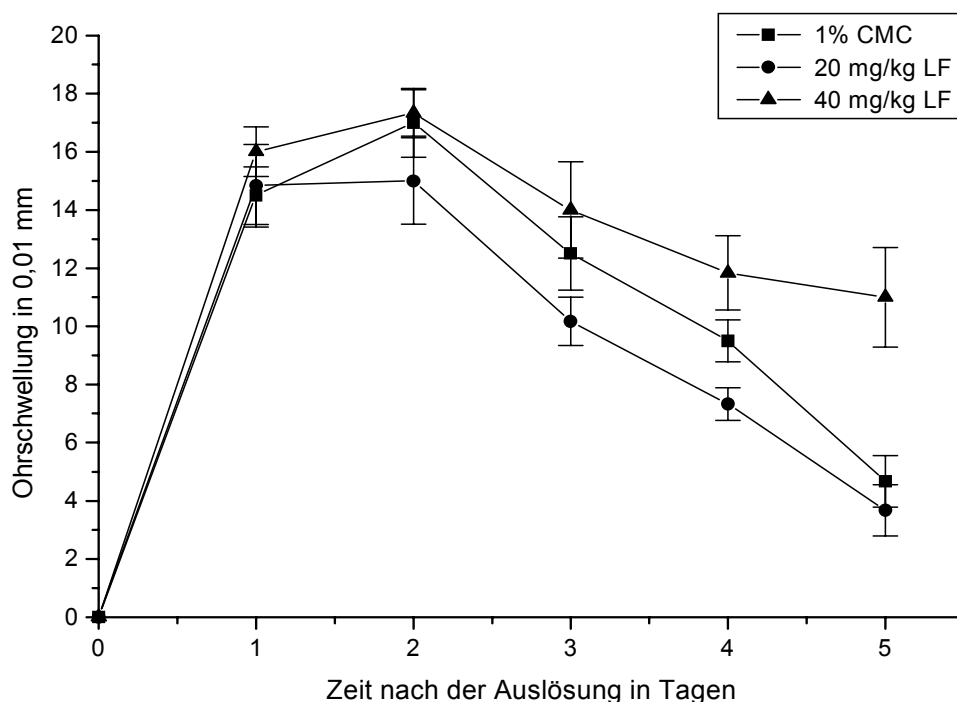


Abb. 35 Schwellungskinetik bei oraler Applikation von Leflunomid nach der Sensibilisierung

Bei diesem Experiment wurden pro Versuchsgruppe 6 BALB/c-Mäuse getestet, indem verschiedene Konzentrationen von LF (20 mg/kg und 40 mg/kg), gelöst in 1% CMC, den LF Mäusen oral gegeben wurde. LF wurde erst am Tag 5, also nach der Sensibilisierung mit DNFB, oral verabreicht und bis zum Ende des Versuchs alle 24 h appliziert. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe 1% CMC oral gegeben, und eine weitere Gruppe blieb unbehandelt. Die Auslösung der Kontaktallergie erfolgte bei allen Gruppen durch Auftragen von jeweils 17 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl-Gemisch) auf das Abdomen an den Tagen 0 und 1. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie durch Auftragen von 7,5 µl 0,4% DNFB (Aceton/Olivenöl) auf das jeweils rechte Ohr der Tiere. Nach der Auslösung wurde die Ohrschwellung alle 24 h gemessen und grafisch dargestellt.

Alle drei Gruppen zeigten schon 24 h nach dem Auslösen eine Schwellungsreaktion, die am Tag 2 anstieg und anschließend wieder abfiel. An den Tagen 1 und 2 lagen die Skaleneinheiten aller Gruppen dicht zusammen, jedoch spalteten sie sich zum Ende des Versuchs etwas auf. Festzuhalten ist, daß die inhibitorische Wirkung von LF hier nicht beobachtet werden konnte. Der Grund dafür scheint in dem Zeitpunkt der LF-Gabe zu liegen. Offenbar wirkt LF nicht inhibitorisch, wenn es nach der Sensibilisierung gegeben wird.

Ein weiteres Experiment diente dem Zweck, den Zeitpunkt der inhibitorischen Wirkung von LF genauer zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden sieben Gruppen mit 40 mg/kg LF, jeweils um einen Tag zeitversetzt, d.h. beginnend an Tag -1 bis Tag 4, oral behandelt. Eine Gruppe erhielt 1% CMC appliziert, und eine Gruppe blieb unbehandelt. Alle Gruppen wurden an den Tagen 0 und 1 mit DNFB sensibilisiert, und am Tag 4 wurde die Schwellungsreaktion ausgelöst. Eine zweite Auslösung erfolgte am Tag 25 durch DNFB-Kontakt. Ein Zeitschema dazu ist in Abb. 36 dargestellt sowie die Schwellungswerte in Abb. 37 A und 37 B.

	Sensibilisierung																			Auslösung		2. Auslösung			
	⇓	⇓																		⇓	⇓	⇓	⇓		
Tage	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	21	22	23	24	25	26		
Gruppe1	x	x	x	x	x	x																			
Gruppe2		x	x	x	x	x	x																		
Gruppe3			x	x	x	x	x	x																	
Gruppe4				x	x	x	x	x	x																
Gruppe5					x	x	x	x	x	x															
Gruppe6						x	x	x	x	x	x														
Gruppe7							x	x	x	x	x	x													
unbeh. Kontrolle																									
1% CMC		x	x	x	x	x	x																		

Abb. 36 Zeitschema für die orale Applikation von LF während der Sensibilisierungsphase

An diesem Versuch nahmen insgesamt neun Gruppen mit je 3 BALB/c Mäusen teil. Die Gruppen 1 bis 7 erhielten zu den angegebenen Zeiten alle 24 h 40 mg/kg LF. Eine Gruppe erhielt an den aufgelisteten Tagen nur 1% CMC. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt weder 1% CMC noch LF. Alle Gruppen wurden mit 25 µl 0,5% DNFB an den Tagen 0 und 1 am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 µl 0,2% DNFB auf jeder Seite des jeweils rechten Ohres der Tiere. Am Tag 25 erfolgte die zweite Auslösung der Kontaktallergie mit 10 µl 0,4% DNFB auf beiden Seiten des jeweils rechten Ohres der Tiere.

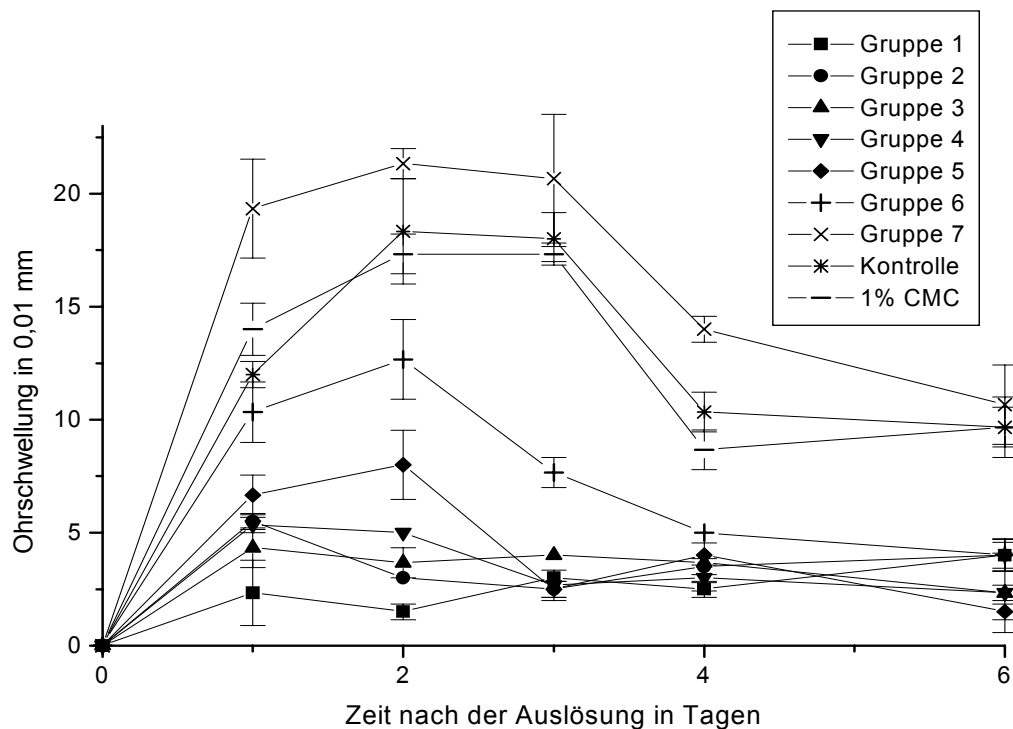


Abb. 37A Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von LF bei einer CHS, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der oralen Applikation

Dieses Experiment wurde, wie in Abb. 36 erklärt, durchgeführt. Die Ohrschwellungswerte der einzelnen Gruppen sind in zeitlicher Abhängigkeit dargestellt.

Zunächst einmal war eine deutliche Schwellung bei der Kontrollgruppe, der Gruppe mit 1%iger CMC-Gabe und bei der Gruppe 7 festzustellen. Geringere Werte wies Gruppe 6 auf. Noch geringere Schwellungswerte zeigten die Gruppen 5, 4, 3, 2 und 1. Die Kontrollgruppe, Gruppe 7 und die Gruppe, der 1% CMC appliziert wurde, wiesen fast identische Werte auf, was zeigt, daß der inhibitorische Effekt von LF bei der Gruppe 7 nicht zu erkennen war. Die abgestuften Reaktionen der anderen Gruppen zeigten, daß die beste Schwellungsinhibition mit dem Zeitschema von Gruppe 1 zusammenfiel. Es war somit wichtig, daß LF vor dem ersten Kontakt mit DNFB schon vorhanden war, wie aus einem Vergleich von Gruppe 1 und 2 geschlossen werden kann. Je später LF in der Sensibilisierungsreaktion eingesetzt wurde, desto schwächer war die Inhibition der Schwellung. Wurde LF erst nach der Auslösung appliziert, also nachdem T-Zellen schon sensibilisiert worden waren, konnte keinerlei Effekt beobachtet werden.

Durch eine zweite Auslösung der Kontaktallergie, die am Tag 25 vorgenommen wurde, sollte ein möglicher Effekt auf sensibilisierte T-Zellen untersucht werden. Die Ohrschwellungswerte sind in Abb. 37 B dargestellt.

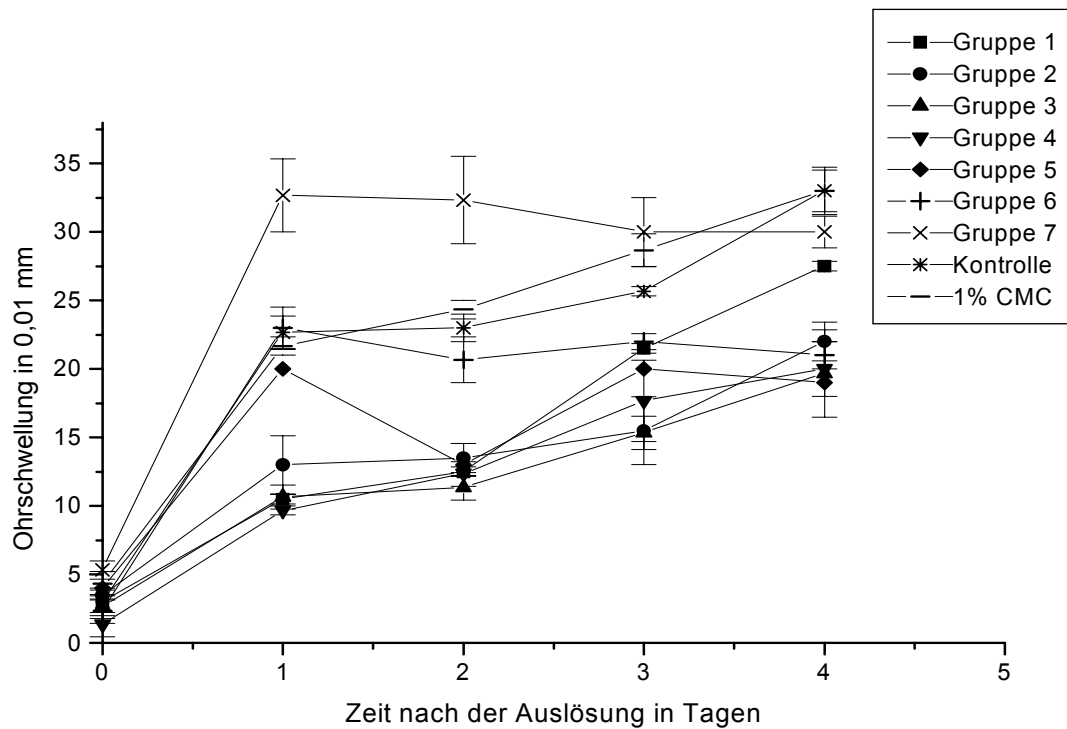


Abb. 37B Zweite Auslösung der Kontaktallergie der Tiere aus dem Versuch gem. Abb.36 am Tag 25

Die Tiere wurden am Tag 25 gem. Abb. 36 mit $10 \mu\text{l}$ 0,4% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr behandelt. Die Ohrschwellungen wurden 24 h später gemessen und deren Werte grafisch festgehalten.

Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, zeigte die Gruppe 7 an den Tagen 26, 27 und 28 die höchsten Ohrschwellungswerte. Danach folgten die Gruppe mit 1%iger CMC-Gabe und die Kontrollgruppe. Die Gruppe 6 und die Kontrollgruppe erreichten am Tag 26 einen Wert von 22 Skaleneinheiten. Die Gruppe 5 lag knapp darunter. Die restlichen Gruppen 1, 2, 3 und 4 lagen dicht zusammen bei der Skaleneinheit 10. Im weiteren Schwellungsverlauf blieb diese Konstellation konstant, d.h. der Abstand zu den Werten der einzelnen Gruppen.

Die niedrigsten Schwellungswerte hatten die Gruppen, die LF während der Sensibilisierungsphase erhielten. Die Schwellung stieg im zeitlichen Verlauf noch an, aber das traf auch auf die Schwellungswerte der Gruppe, die kein LF oder LF erst nach der Auslösung appliziert bekam, zu. Die Hypothese - je später LF im Verlauf des Versuchs eingesetzt wird, desto schwächer ist der inhibitorische Effekt von LF - läßt sich hier bestätigen. Anscheinend wirkt LF inhibitorisch beim Priming von T-Zellen während der Sensibilisierungsphase der kontaktallergischen Reaktion. Die deutlich schwächeren Schwellungswerte der Gruppen 1-4 ließen sich kausal auf den Zeitpunkt der LF-Gabe zurückführen. Es wurden eventuell weniger hapten-spezifische T-Zellen sensibilisiert, die dann bei der 2. Auslösung anfänglich nicht sofort eine starke inflammatorische Reaktion bedingten. Dagegen hatte LF keinen inhibitorischen Effekt auf die kontaktallergische Reaktion, wenn es nach der Auslösung appliziert worden war, da genügend geprimte T-Zellen vorhanden waren.

Offen ist allerdings die Frage, ob LF, wenn bereits vor der Sensibilisierung mit dem Kontaktallergen gegeben, eine suppressive Wirkung auf den Schwellungsverlauf haben könnte. Diese Fragestellung ist für einen Patienten interessant, der vor Berührung mit einem Kontaktallergen durch Einnahme von LF einer CHS-Reaktion entgehen möchte.

Im folgenden Versuch wurde LF 5 Tage lang verabreicht. 7 Tage vor der Sensibilisierung mit DNFB wurde die Fütterung mit LF eingestellt. Anschließend erfolgte die Messung der Schwellungsreaktion (Abb. 38 und 39).

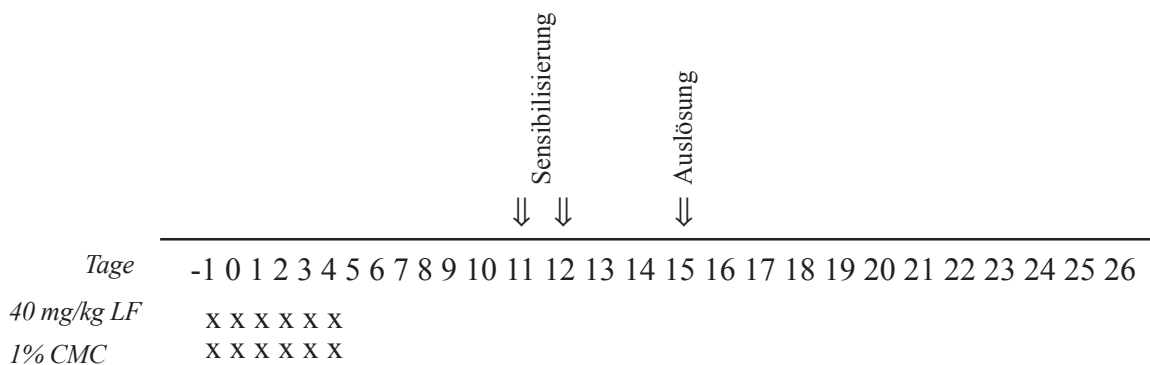


Abb. 38 Zeitschema der oralen Applikation von LF vor der Sensibilisierung mit DNFB

An diesem Versuch nahmen je Gruppe 8 BALB/c Mäuse teil. Die erste Gruppe erhielt an den Tagen -1 bis 4 an alle 24 h 40 mg/kg LF, während der zweiten Gruppe zwecks Kontrolle nur 1% CMC appliziert wurde. An den Tagen 11 und 12 wurden beide Gruppen mit 25 μ l 0,5% DNFB am Abdomen behandelt. Am Tag 15 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres der Tiere.

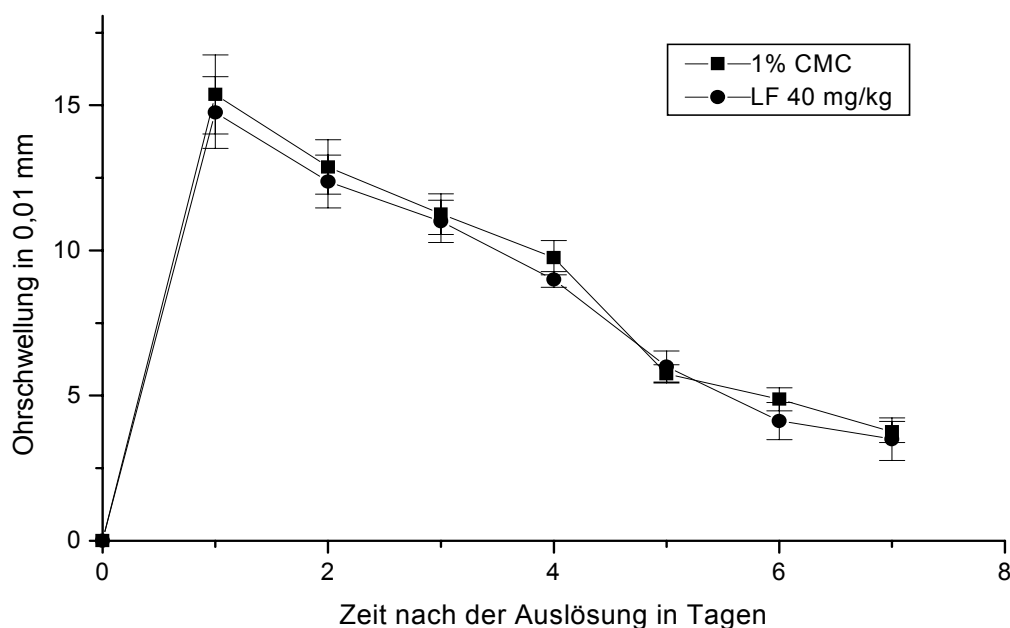


Abb. 39 Schwellungskinetik bei oraler Applikation von Leflunomid vor der Sensibilisierung

Der zeitliche Verlauf der LF-Applikation wurde bereits in Abb. 38 dargestellt. Die Ohrschwellungen der Tiere wurden 24 h nach der Auslösung gemessen und hier in zeitlicher Abhängigkeit dargestellt.

Der Grafik ist zu entnehmen, daß die Gabe von LF zu einem bestimmten Zeitpunkt vor der CHS-Reaktion keinen Einfluß mehr auf den Schwellungsverlauf hatte. Die beiden Gruppen unterschieden sich kaum, was die Schwellungswerte anbetrifft. Ein supprimierender Effekt auf die Schwellungsreaktion, wie er bei der oralen Applikation von LF während der Sensibilisierungsphase beobachtet werden konnte, trat hier nicht auf. Offenbar bewirkte LF keine präventive Suppression der CHS-Reaktion im Vorfeld. Eine suppressive Wirkung war nur dann zu beobachten, wenn LF während der Sensibilisierungsphase gegeben worden war.

7 Transfer von immunkompetenten Zellen aus LF-behandelten Mäusen

Zur näheren Charakterisierung der Suppression der Schwellungsreaktion wurde die Übertragbarkeit der Suppression auf naive Tiere untersucht. Dazu wurde ein adoptiver Zelltransfer durchgeführt. Hierbei wurde den Mäusen LF während der Sensibilisierungsphase verabreicht und die Schwellungsreaktion ausgelöst und gemessen. Nach drei Tagen konnten dann die Milz und die drainierenden Lymphknoten entnommen werden, um eine Einzelzellsuspension daraus herzustellen. Die so gewonnenen Zellen wurden i.v. auf naive Mäuse übertragen, und 24 h später erfolgte die Sensibilisierung der Tiere. Nach der Auslösung wurde die Schwellungsreaktion gemessen. Der zeitliche Ablauf der einzelnen Phasen ist in Abb. 40 angegeben. In Abb. 41 sind die Ohrschwellungswerte der Donor-Mäuse von der Auslösung der Kontaktallergie bis zum Transfer in die Rezipienten dargestellt. Die Gruppe, die während der Sensibilisierungsphase 1% CMC erhalten hatte, zeigte am Tag 1 bereits eine Schwellung von 16 Skaleneinheiten. An den Tagen 2 und 3 verringerte sich die Schwellung auf 14 Skaleneinheiten. Die Gruppen, die während der Sensibilisierungsphase 40 mg/kg LF erhalten hatten, wiesen dagegen nur eine geringfügige Schwellungsreaktion auf. Die drainierenden Lymphknoten und Milzen dieser Tiere wurden am Tag 7 für den Transfer verwendet.

In Abb. 42 A sind die Ohrschwellungswerte der Rezipienten 24 h nach der Auslösung der Kontaktallergie angegeben, und in Abb. 42 B ist der Schwellungsverlauf der kontaktallergischen Reaktion dargestellt.

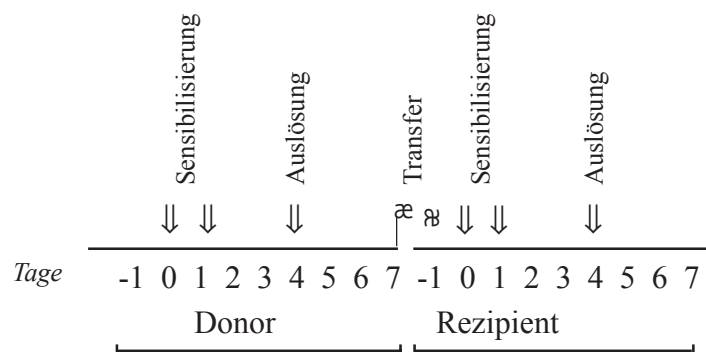


Abb. 40 Zeitschema des Zelltransfers von Abb. 42

An diesem Versuch nahmen je Gruppe 6 BALB/c Mäuse teil. Die erste Donor-Gruppe erhielt an den Tagen -1 bis 4 alle 24 h 40 mg/kg LF, während der zweiten Donor-Gruppe zur Kontrolle nur 1% CMC appliziert wurde. Beide Donor-Gruppen wurden an den Tagen 0 und 1 mit 25 μ l 0,5% DNFB auf dem Abdomen sensibilisiert. Am Tag 4 wurde die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres der Tiere durchgeführt. An den Tagen 5 bis 7 wurde die Ohrschwellung gemessen (Abb. 41). Am Tag 7 wurden Milz und die drainierenden Lymphknoten (cervical, axillär und inguinal) entfernt, und daraus wurde eine Einzelzellsuspension angefertigt. Es wurden dann pro Rezipient 1×10^8 Zellen in die Schwanzvene gespritzt. An den Tagen 0 und 1 wurden beide Rezipienten-Gruppen sowie die Kontrollgruppe 1 mit 25 μ l 0,5% DNFB am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres der Tiere. Die Kontrollgruppe 2 wurde nur am Tag 12 mit 10 μ l 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres behandelt. Von Tag 5 an erfolgte die Messung der Ohrschwellungen.

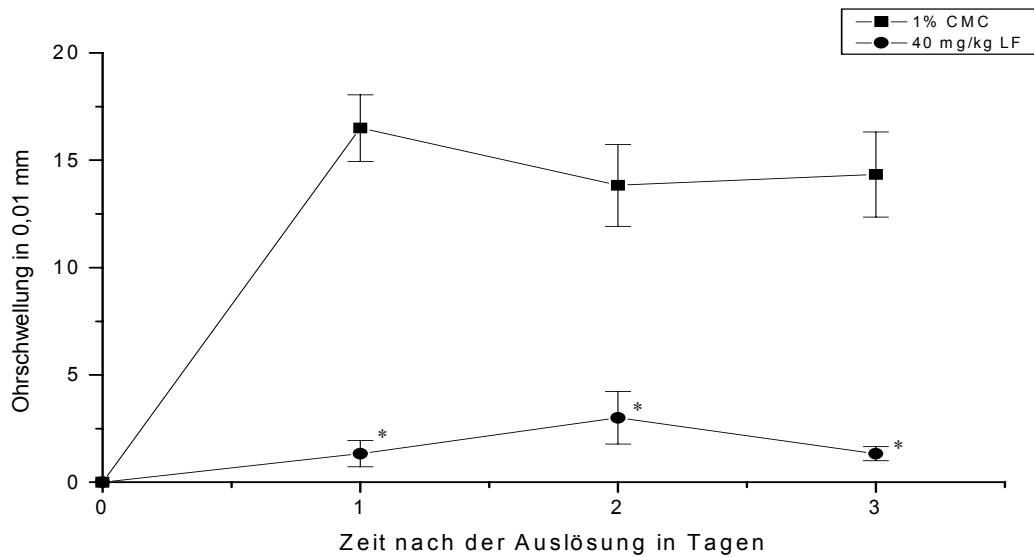


Abb. 41 Ohrschwellungsverlauf der DNFB-induzierten CHS der Donor-Mäuse

Bei dem in Abb. 40 beschriebenen Versuch wurden die zwei Donor-Gruppen von je 6 Mäusen mit DNFB behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 0 und 1 mit je 25 μ l 0,5% DNFB (Aceton/Olivenöl 4:1) am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Einer Gruppe wurden alle 24 h, beginnend am Tag -1, oral 40 mg/kg Leflunomid appliziert, und eine weitere Gruppe bekam eine 1%ige CMC-Lösung zur Kontrolle oral appliziert. LF bzw. CMC wurde kontinuierlich alle 24 h bis zum Tag 4 verabreicht und dann eingestellt. Die Messung der Ohrschwellungen der Tiere wurden an den Tagen 5, 6 und 7 gemessen und grafisch dargestellt. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

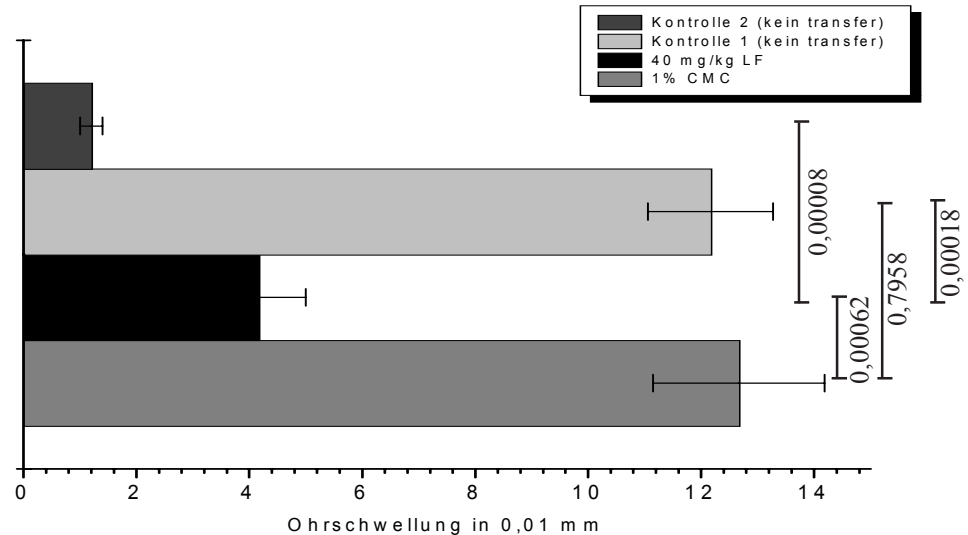


Abb. 42A Vergleich der Ohrschwellungswerte der Rezipienten 24 h nach der Auslösung

Der zeitliche Verlauf des Transfersversuchs wurde bereits in Abb. 40 dargestellt. Bei diesem Experiment bestanden die vier Versuchsgruppen aus jeweils 6 Tieren. Die Messung der Ohrschwellungen der Tiere erfolgte 24 h nach der Auslösung. Der Kontrollgruppe 1 wurden keine Zellen transferiert. Sie wurde lediglich mit DNFB gem. vorheriger Abbildung bis zur Auslösung sensibilisiert. Die Kontrollgruppe 2 bekam ebenfalls keinen Zelltransfer und wurde auch nicht sensibilisiert, sondern lediglich der Auslösung unterzogen. Die Gruppe, die während der Sensibilisierung mit 1% CMC behandelt wurde und der Zellen von Donoren übertragen wurden, ist mit "1% CMC" bezeichnet und diejenige, die 40 mg/kg LF erhielt, mit "40 mg/kg LF". Die eingezeichneten Linien geben die p-Werte der verglichenen Gruppen an. Es kam der unabhängige t-Test zur Anwendung.

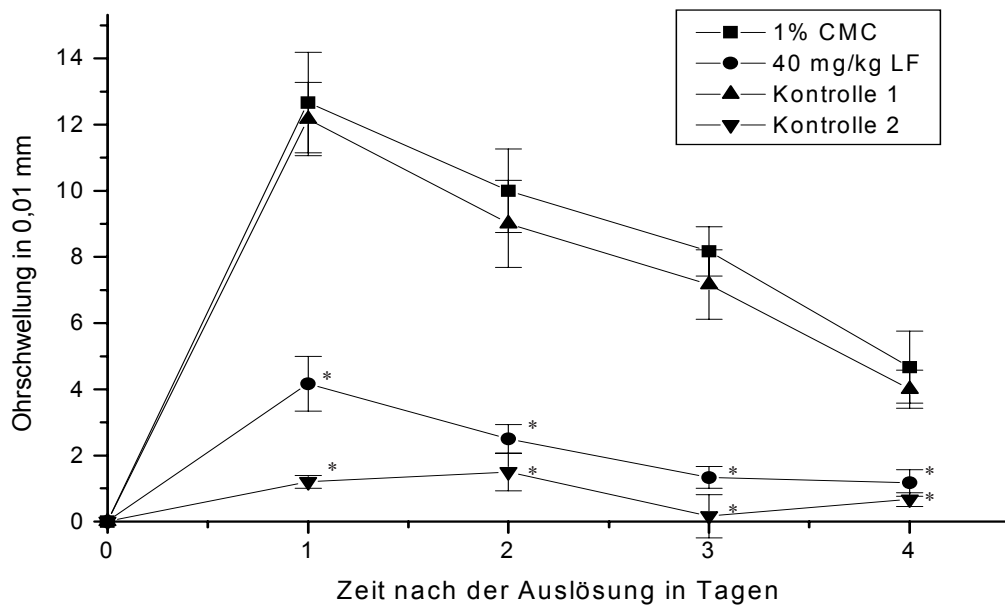


Abb. 42B Ohrschwellungskinetik der Rezipienten

Der zeitliche Verlauf des Transfersversuchs wurde bereits in Abb. 40 dargestellt. Die Messung der Ohrschwellungen der Rezipienten erfolgte 24 h nach der Auslösung bis zum Tag 4. Der Kontrollgruppe 1 wurden keine Zellen transferiert. Sie wurde lediglich mit DNFB bis zur Auslösung sensibilisiert. Die Kontrollgruppe 2 bekam ebenfalls keinen Zelltransfer und wurde auch nicht sensibilisiert, sondern nur der Auslösung unterzogen. Die mit 1% CMC bzw. 40 mg/kg LF bezeichnete Gruppe erhielt Zellen von Donoren, die während der Sensibilisierungsphase CMC oder LF oral appliziert bekamen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Wie bei der Kontrollgruppe 1 in Abb. 42 A zu beobachten war, betrug der Schwellungswert bereits nach 24 h 12 Skaleneinheiten. Die Kontrollgruppe 2, bei der ohne vorhergehende Sensibilisierung nur die Auslösung der kontaktallergischen Reaktion vorgenommen wurde, zeigte nur den geringen Wert von einer Skaleneinheit. Die Gruppe, der immunkompetente Zellen von CMC-behandelten Donoren transferiert wurden, erreichte eine Schwellungsreaktion, die auf gleichem Niveau wie die der Kontrollgruppe 1 lag. Die Gruppe, die Zellen von LF-behandelten Donoren transferiert bekam, zeigte eine Schwellungsreaktion von 4 Skaleneinheiten.

Festzuhalten ist, daß die Dosis zur Auslösung einer kontaktallergischen Reaktion zu gering war, um eine Schwellungsreaktion hervorzurufen (Kontrollgruppe 2). Eine vorherige Sensibilisierung mit DNFB ist für eine CHS-Reaktion erforderlich (Kontrollgruppe 1). Transferierte Donor-Zellen von LF-behandelten Mäusen bewirkten allerdings eine Inhibition der Schwellungsreaktion der Rezipienten. Es wurden also immunkompetente Zellen übertragen, die möglicherweise suppressiv auf eine CHS-Reaktion gewirkt haben könnten. LF bewirkt anscheinend die Generierung von suppressiven Zellen in den behandelten Tieren, und diese sind auch noch nach dem Transfer in naiven Tieren wirksam.

In der folgenden Grafik (Abb. 42 B) ist die Schwellungskinetik über den gesamten Zeitraum dargestellt. Der maximale Schwellungswert wurde bereits nach 24 h erreicht. Danach war ein Nachlassen der Schwellungsreaktion festzustellen. Deutlich abgesetzt waren die Schwellungsverläufe der CMC- und der Kontrollgruppe 1 auszumachen. Die Schwellungswerte beider Gruppen verliefen nahezu parallel zueinander und waren nicht signifikant unterschiedlich. Die LF-Gruppe besaß am Tag 1 einen höheren Schwellungswert als die Kontrollgruppe 2, jedoch von Tag 2 an waren die Schwellungswerte nahezu identisch. Die Kontrollgruppe 2 hatte, wie erwartet, keine Schwellungsreaktion, da die geringe DNFB-Dosis bei der Auslösung der kontaktallergischen Reaktion keine Schwellung bewirken konnte.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die Inhibition der kontaktallergischen Reaktion übertragbar ist. LF inhibiert nicht nur inflammatorische Prozesse, sondern bewirkt auch die Entstehung einer Langzeitwirkung, die konkret mit suppressiv wirksamen Zellen verknüpft werden kann. Diese suppressiv wirksamen Zellen sind auf naive Tiere übertragbar und bewirken dort ebenfalls eine Inhibition der allergischen Reaktion.

Um nun die suppressiv wirksamen Zellen genauer charakterisieren zu können, wurde erneut ein adoptiver Transfer durchgeführt. Bei DTH-Reaktionen scheinen Th1-Zellen die Immunantwort zu bestimmen. Dagegen scheinen bei kontaktallergischen Reaktionen IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellen die Effektorzellen zu sein, während IL-4/IL-10-produzierende CD4⁺-Zellen gegenregulatorische Funktionen erfüllen. Bei dem folgenden Transfer-Versuch wurden aus diesem Grund die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen vor dem Transfer depletiert. In den folgenden Abb. 43 bis 47 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Abb. 43 gibt den zeitlichen Verlauf des Experiments wieder. In Abb. 44 sind die Schwellungswerte der Donor-Mäuse von dem Zeitpunkt der Auslösung bis zum Transfer dargestellt. 24 h nach der Auslösung der kontaktallergischen Reaktion zeigte die Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte, eine Schwellung von 10 Skaleneinheiten, die am Tag 2 bis auf 14 anstieg und am Tag 3 auf 9 Skaleneinheiten zurückfiel. Die Gruppen, die während der Sensibilisierungsphase 40 mg/kg LF appliziert bekamen, wiesen nur eine geringfügige Schwellungsreaktion auf. Die Milz und drainierenden Lymphknoten der so vorbehandelten

Mäuse wurden am Tag 7 entnommen, und daraus wurde eine Zellsuspension hergestellt. Die CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen wurden dann mit Hilfe von paramagnetischen Beads depletiert, und der Erfolg der Depletion wurde im FACS überprüft. In Abb. 45 sind Zytofluorometrische Analysen bezüglich der Depletion der CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen dargestellt. Die Zellsuspension, bei der die CD4-positiven T-Zellen depletiert wurden, hatte folglich einen Anteil von 0,5% CD4- und 31,7% CD8-positiven T-Zellen, während die Zellsuspension, bei der die CD8-positiven T-Zellen depletiert wurden, 19,1% CD4- und 1,5% CD8 positive T-Zellen besaß. Die CD4- bzw. CD8-depletierten sowie undepletierten Zellsuspensionen von 1% CMC bzw. 40 mg/kg von LF-behandelten Mäusen wurden i.v. den Rezipienten übertragen, und sodann wurde eine kontaktallergische Reaktion mit DNFB ausgelöst. Die Ohrschwellungswerte, 24 h später ermittelt, sind in Abb. 46 A-C dargestellt.

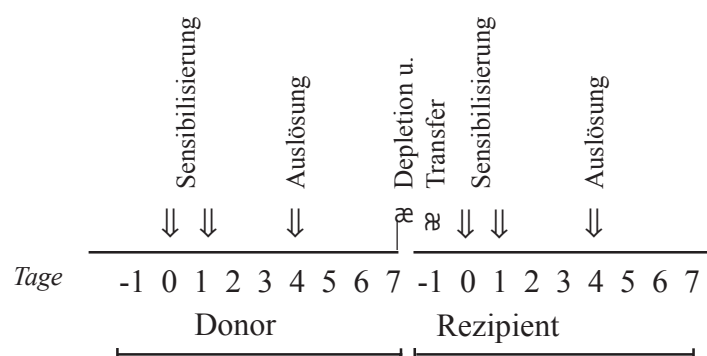


Abb. 43 Zeitschema des adoptiven Zelltransfers

An diesem Versuch nahmen 6 Gruppen von je 6 BALB/c Mäusen teil. Die ersten drei Donor-Gruppen erhielten von den Tagen -1 bis 4 alle 24 h 40 mg/kg LF, während der vierten Donor-Gruppe als Kontrolle nur 1% CMC appliziert wurde. Alle Donor-Gruppen wurden an den Tagen 0 und 1 mit 25 µl 0,5% DNFB auf dem Abdomen sensibilisiert. Am Tag 4 wurde die Kontaktallergie durch Auftragen von 10 µl 0,2% DNFB auf jede Seite des rechten Ohres ausgelöst. An den Tagen 5 bis 7 wurde die Ohrschwellung der Tiere gemessen (Abb.44). Am Tag 7 wurden die Milz und die drainierenden Lymphknoten (cervical, axillär und inguinal) gewonnen, um daraus eine Einzelzellsuspension anzufertigen. Mit Hilfe von Dynabeads wurden dann die CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen depletiert (Die Depletion der Zellen wurde mittels Fluoreszenzzytometrie überprüft, Abb.45) und pro Rezipient 1 x 10⁸ Zellen in die Schwanzvene gespritzt. An den Tagen 0 und 1 wurden alle Rezipienten-Gruppen sowie die Kontrollgruppe mit 25 µl 0,5% DNFB am Abdomen sensibilisiert. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 µl 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres der Tiere. Die Kontrollgruppe 2 wurde nur am Tag 12 mit 10 µl 0,2% DNFB auf jeder Seite des rechten Ohres behandelt. Von Tag 5 an erfolgte die Messung der Ohrschwellungen.

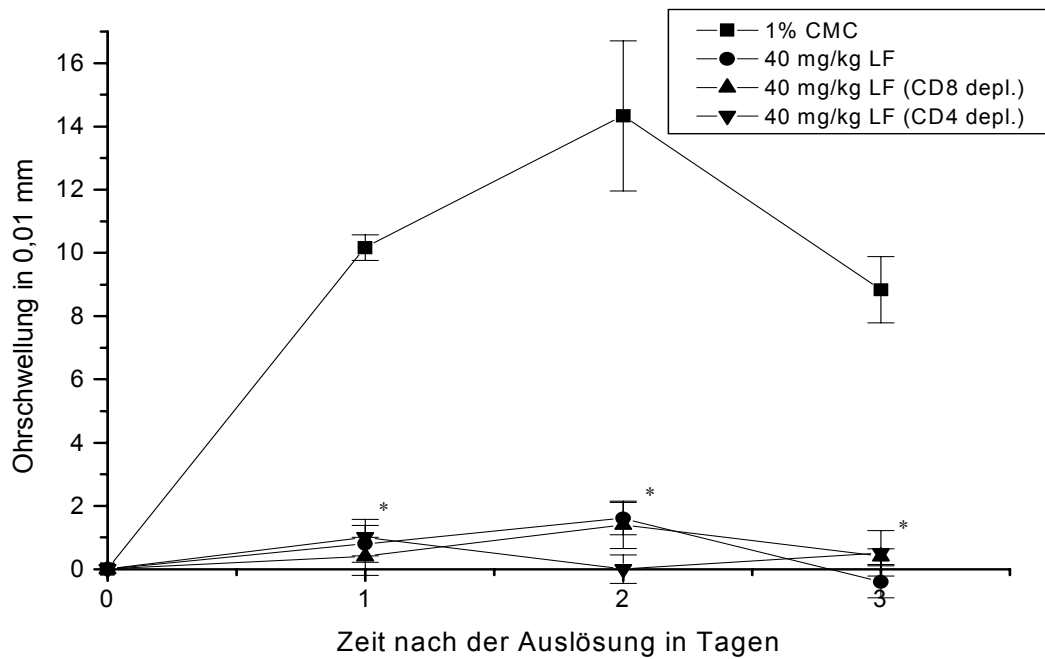


Abb. 44 Ohrschwellungsverlauf der DNFB-induzierten CHS bei Donor-Mäusen

Bei diesem Versuch wurden die teilnehmenden 4 Donor-Gruppen von je 6 Mäusen mit DNFB und an den Tagen 0 und 1 mit je 25 μ l 0,5% DNFB (Aceton/Olivenöl 4:1) am Abdomen behandelt. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung mit 10 μ l 0,2% DNFB auf dem jeweils rechten Ohr der Tiere. Drei Gruppen wurden alle 24 h, beginnend am Tag -1, oral 40 mg/kg Leflunomid appliziert, und einer Gruppe wurde eine 1%ige CMC-Lösung als Kontrolle oral appliziert. LF bzw. CMC erhielten die Tiere kontinuierlich alle 24 h bis zum Tag 4. Die Ohrschwellung der Tiere wurde an den Tagen 5, 6 und 7 gemessen und grafisch dargestellt. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

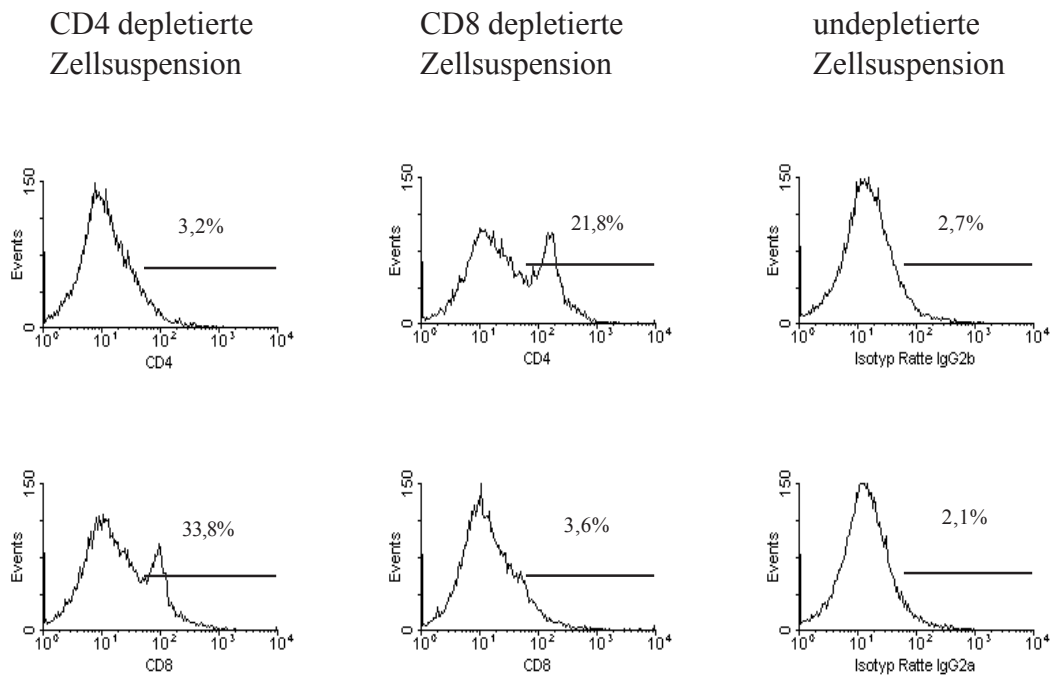


Abb. 45 Fluoreszenzserologische Analyse bzgl. der Expression von CD4 bzw. CD8 auf depletierten Milzzellen der Donoren

Bei dem in Abb.43 beschriebenen Versuch wurden die Milzzellen von zwei mit LF-behandelten Donor-Gruppen (LF und CD4 bzw. CD8 depl.) mit den Antikörpern GK1.5 (Ratte-anti-CD4) bzw. 53.6.72 (Ratte-anti-CD8) inkubiert. Danach wurden Dynabeads (Schaf-anti-Ratte IgG) im Verhältnis 1:3 hinzugegeben und inkubiert. Nach der Trennung der CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen am Magneten wurden die depletierten Zellen mit GK1.5 (ÜS) bzw. 53.6.72 (ÜS) versetzt. Der Rattenantikörper wurde anschließend mit einem Maus-anti-Ratte IgG F(ab')₂^{DTAF} (1:100) nachgewiesen. Die Isotypfärbungen wurden mit der undepletierten Zellsuspension durchgeführt.

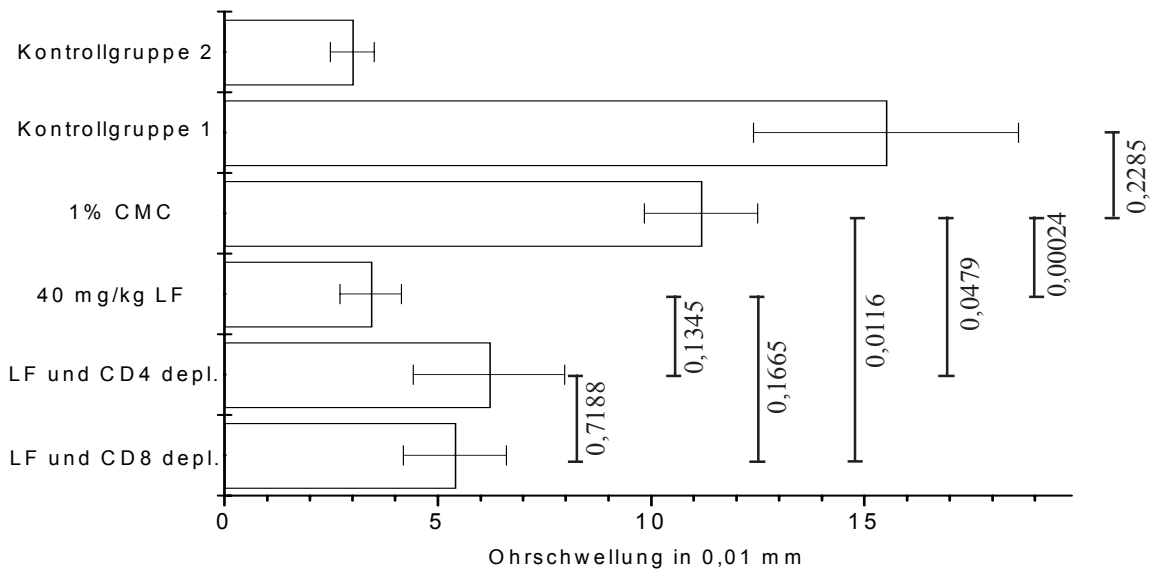


Abb. 46A Vergleich der Ohrschwellungswerte der Rezipienten 24 h nach dem Zelltransfer. Der zeitliche Verlauf des Transfersversuchs wurde bereits in Abb.43 dargestellt. Die Ohrschwellungen der Tiere wurden 24 h nach der Auslösung der Kontaktallergie gemessen. Der Kontrollgruppe 1 wurden keine Zellen transferiert. Sie wurde lediglich mit DNFB bis zur Auslösung sensibilisiert. Die Kontrollgruppe 2 erhielt ebenfalls keinen Zelltransfer und wurde auch nicht sensibilisiert, sondern nur der Challengebehandlung unterzogen. Zwei Gruppen erhielten Zellen von LF- bzw. CMC-behandelten Tieren, und zwei Gruppen bekamen Zellen von LF-behandelten Tieren, deren $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -T-Zellen depletiert worden waren. Die eingezeichneten Linien geben die p-Werte der zu vergleichenden Gruppen an. Es kam der unabhängige t-Test zur Anwendung.

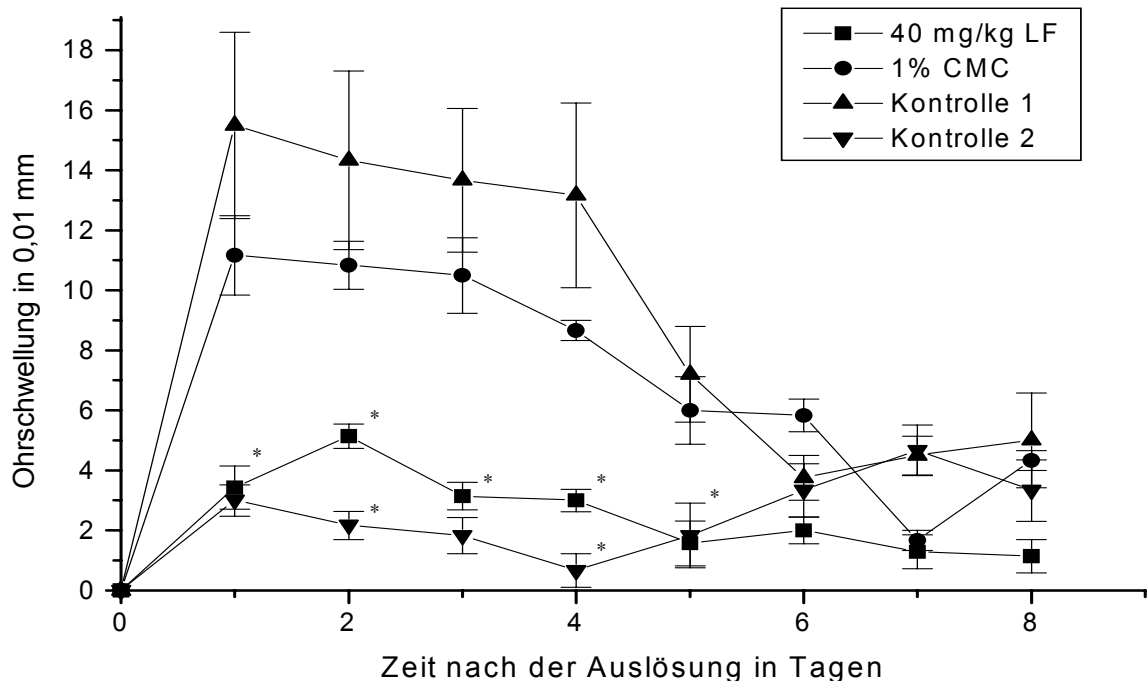


Abb. 46B Ohrschwellungskinetik der Rezipienten nach Zelltransfer

Der zeitliche Verlauf des Transfersversuchs wurde bereits in Abb.43 dargestellt. Die Messung der Ohrschwellungen der Rezipienten erfolgte 24 h nach der Kontaktallergieauslösung bis zum Tag 8. Der Kontrollgruppe 1 wurden keine Zellen transferiert. Sie wurde nur mit DNFB bis zur Auslösung sensibilisiert. Die Kontrollgruppe 2 erhielt keinen Zelltransfer und wurde auch nicht sensibilisiert, sondern nur der Auslösung unterzogen. Den mit "1% CMC" bzw. "40 mg/kg LF" bezeichneten Gruppen wurden Zellen von Donoren übertragen, denen während der Sensibilisierungsphase CMC oder LF oral appliziert worden war. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

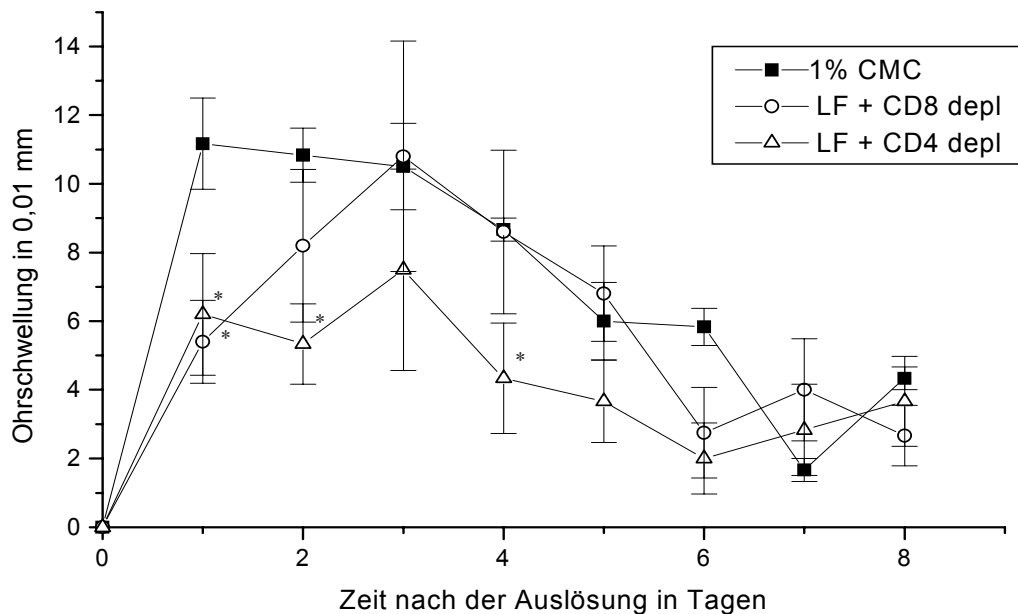


Abb. 46C Ohrschwellungskinetik der Rezipienten nach Zelltransfer von CD4⁺- bzw. CD8⁺-depletierten Zellen

Der zeitliche Verlauf des Transferversuchs wurde bereits in Abb.43 dargestellt. Die Messung der Ohrschwellungen der Rezipienten erfolgte 24 h nach der Kontaktallergieauslösung bis zum Tag 8. Den mit "LF + CD4 depl." bzw. "LF + CD8 depl." bezeichneten Gruppen wurden Zellen transferiert, die von LF-behandelten Donoren stammten, deren CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen depletiert worden waren. Die offenen Symbole stehen für die Gruppe, der 1% CMC appliziert wurde, die geschlossenen für die mit LF-behandelten Gruppen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die Kontrollgruppe 2 in Abb. 46 A wies kaum eine Schwellung auf, da die Ohren der Mäuse nur mit 10µl 0,2% DNFB behandelt worden waren. Die Kontrollgruppe 1 zeigte die höchste Schwellung 24 h nach der Auslösung, vergleichbar mit der CMC-Gruppe, die eine Schwellung von 11 Skaleneinheiten aufwies. Die Gruppe, der undepletierte Zellen von LF-behandelten Mäusen transferiert worden waren, zeigte wie die Kontrollgruppe 2 kaum eine Schwellungsreaktion. Die Schwellungswerte der LF-Gruppe waren signifikant unterschiedlich gegenüber der CMC-Gruppe bzw. der Kontrollgruppe 1. Die beiden Gruppen, die depletierte Zellen aus LF-behandelten Mäusen transferiert bekamen, unterschieden sich nicht signifikant von der LF-Gruppe, obwohl sie etwas höhere Schwellungswerte aufwiesen als diese Gruppe. Sie verhielten sich untereinander auch nicht signifikant unterschiedlich, zeigten aber einen deutlichen signifikanten Unterschied zur CMC-Gruppe.

Abb. 46 B stellt die Schwellungskinetik der einzelnen Gruppen über einen Zeitraum von 8 Tagen dar. Die Gruppe, der Zellen von LF-behandelten Tieren übertragen wurden, hatte anfangs wie die Kontrollgruppe 2 eine Schwellung von ca. 3 Skaleneinheiten, die dann auf 5 anstieg und anschließend auf eine Skaleneinheit abfiel. Sie wies während des gesamten Zeitraums, verglichen mit der Kontrollgruppe 1 und der CMC-Gruppe, eine geringe Schwellungsreaktion auf. Die Gruppe, der Zellen von CMC-behandelten Tieren transferiert wurden, wies eine hohe Schwellungsreaktion auf, ähnlich wie die der Kontrollgruppe 1. Die Ohrschwellungen der Kontrollgruppe 1 zeigten die höchsten Werte in diesem Versuch. Die Werte der Kontrollgruppe 2, die nur der Auslösung der kontaktallergischen Reaktion unterzogen worden war, lagen auf niedrigem Niveau während des gesamten Versuchs.

Die Gruppe in Abb. 46 C, die CD8⁺ depletierte Zellen von LF-behandelten Tieren erhielt, verzeichnete einen Anstieg der Schwellung, der am Tag 3 bei 11 Skaleneinheiten gipfelte. Danach fiel die Schwellung wie bei der CMC-Gruppe ab. Die Gruppe, der CD4⁺-depletierte Zellen von LF-behandelten Mäusen transferiert wurden, zeigte am Tag 1 einen Anstieg der Schwellung auf 5 Skaleneinheiten, danach einen Abfall und dann wiederum einen leichten Anstieg der Schwellungswerte. Die Werte schwankten von 7 bis 4 Skaleneinheiten bis zum Tag 5, um danach auf ein niedriges Niveau abzufallen. Die Werte der beiden Gruppen sind am Tag 1 signifikant unterschiedlich zu den Werten der CMC-Gruppe. An den Tagen 2 und 4 sind nur noch die Werte der Gruppe, die CD4-depletierte Zellen von LF behandelten Donoren übertragen bekam, deutlich zu unterscheiden von den Schwellungswerten der CMC-Gruppe. Die geringere Schwellungsreaktion der CD4-depletierten Gruppe weist auf einen Einfluß der depletierten Zellen hin.

Nach einem Zeitraum von 168 Tagen erfolgte eine erneute Konfrontation der Tiere aus diesem Versuch mit DNFB. Allen Gruppen wurden 10 µl 0,2% DNFB auf jede Seite des jeweils rechten Ohres aufgetragen. 24 h später wurde die Zunahme der Ohrschwellung gemessen und in Abb. 47 A, B grafisch dargestellt.

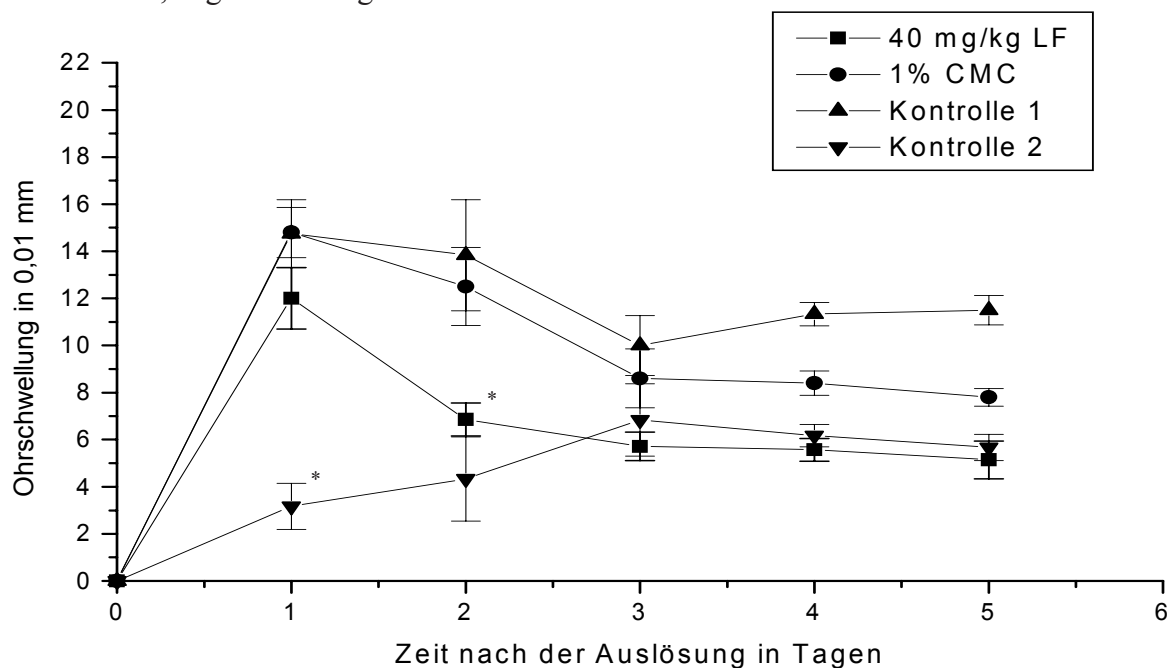


Abb. 47A Ohrschwellungskinetik der Rezipienten nach Zelltransfer und erneuter Auslösung einer kontaktallergischen Reaktion

168 Tage nach dem Experiment gem. Abb.43 wurde das jeweils rechte Ohr der betreffenden Tiere noch einmal mit 10 µl 0,2% DNFB konfrontiert und 24 h später die daraus resultierende Ohrschwellung gemessen.

Der zeitliche Verlauf des Transferversuchs wurde in Abb. 43 dargestellt. Der Kontrollgruppe 1 wurden keine Zellen transferiert. Sie wurde nur mit DNFB gem. vorheriger Abb. bis zur Auslösung sensibilisiert. Die Kontrollgruppe 2 erhielt keinen Zelltransfer und wurde auch nicht sensibilisiert, sondern nur der Auslösung der Kontaktallergie unterzogen. Den mit 1% CMC bzw. 40 mg/kg LF bezeichneten Gruppen wurden Zellen von Donoren übertragen, denen während der Sensibilisierungsphase CMC oder LF oral appliziert worden war. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$). In Abb. 47B sind die Schwellungswerte der Gruppen, denen CD4- bzw. CD8-depletierte Zellen von LF-behandelten Mäusen übertragen worden waren zwecks Vergleich zu der Gruppe, die Zellen von Donoren, die 1% CMC erhalten hatten, übertragen bekam, dargestellt.

Die Gruppe, der Zellen von LF-behandelten Tieren übertragen worden waren (Abb. 47 A), zeigte am Tag 1 einen Schwellenwert von 12, der dann an den folgenden Tagen abfiel und am

fünften Tag 5 Skaleneinheiten betrug. Die Gruppe, der Zellen von CMC-behandelten Tieren transferiert wurden, hatte am Tag 1 einen Schwellungswert von 15 Skaleneinheiten, der bis zum Tag 5 auf 7 abfiel. Die Kontrollgruppe 1 zeigte am Tag 1 den zweithöchsten Schwellungswert, der sich im Laufe der Reaktion langsam reduzierte. Am Tag 5 hatte die Kontrollgruppe 1 den höchsten Schwellungswert von 12 Skaleneinheiten zu verzeichnen. Bei der Kontrollgruppe 2 konnte - im Gegensatz zu den anderen Gruppen - am Tag 1 kaum eine Schwellungsreaktion ermittelt werden.

In Abb. 47 B sind die Schwellungswerte der Gruppen dargestellt, denen CD4⁺- bzw. CD8⁺-depletierte Zellen von LF-behandelten Mäusen transferiert worden waren.

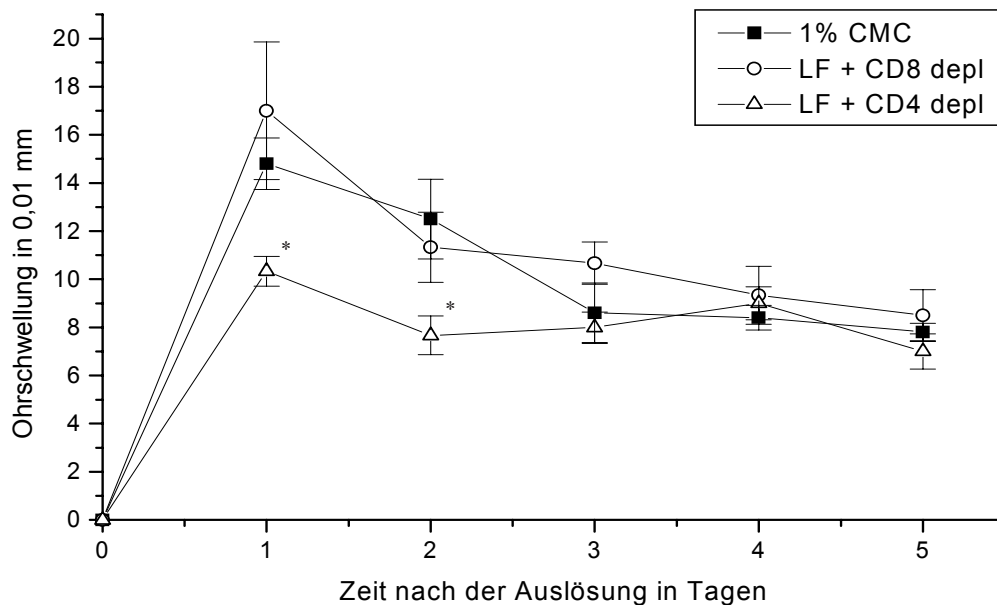


Abb. 47B Ohrschwellungskinetik der Rezipienten nach Zelltransfer von CD4⁺- bzw. CD8⁺-depletierten Zellen und erneuter Auslösung einer Kontaktallergie

Den Mäusen der mit "LF + CD4 depl." bzw. "LF + CD8 depl." bezeichneten Versuchsgruppen wurden Zellen transferiert, die von LF-behandelten Donoren stammten, wobei CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen depletiert wurden. Die offenen Symbole stehen für die Kontrollgruppen, die geschlossenen für die mit LF-behandelten Gruppen. Die mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zu den Werten der Gruppe, die 1% CMC erhalten hatte ($p < 0,05$).

Die Gruppe, der CD8-depletierte Zellen von LF-behandelten Donoren transferiert wurden, hatte am Tag 1 ihre höchste Schwellung, die sich im weiteren Verlauf kontinuierlich verringerte. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Werten der CMC-Gruppe - im Gegensatz zu den Schwellungswerten an den Tagen 1 und 2 der Gruppe, die CD4⁺-depletierte Zellen von LF-behandelten Mäusen übertragen bekam. Die etwas abgeschwächte Schwellungsreaktion der Tiere, denen CD4-depletierte Zellen von LF-behandelten Tieren transferiert wurden, weist auf einen Einfluß der depletierten Zellen auf die Kontaktallergie hin.

Insgesamt läßt sich der inhibitorische Charakter von LF bei der Schwellungsreaktion bestätigen. Der Ohrschwellungsverlauf der LF-Gruppe, verglichen mit dem der Kontrollgruppe 1 sowie der CMC-Gruppe, war signifikant verschieden. Es konnte in diesem Versuch allerdings nicht gefunden werden, daß CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen allein für die inhibitorische Wirkung von LF während einer kontaktallergischen Reaktion verantwortlich sind. Die volle Inhibition der Schwellung wurde durch den Transfer von allen immunkompetenten Zellen erreicht.

8 Histologische Charakterisierung der Langerhans-Zellen von Leflunomid-behandelten Mäusen unter dem Einfluß von DNFB

Zwecks Klärung der Frage, ob durch die Behandlung der Mäuse mit Leflunomid die Langerhans-Zellen in ihrer morphologischen Struktur beeinträchtigt werden könnten, wurden Epidermal Sheets von Leflunomid-behandelten Mäusen, die mit DNFB konfrontiert worden waren, angefertigt. Eine Gruppe von Mäusen wurde mit 40 mg/kg LF oral behandelt. Während einer Gruppe 1% CMC verabreicht wurde, blieb eine weitere Gruppe dagegen unbehandelt. Die orale Behandlung erfolgte am Tag -1 und wurde alle 24 h bis Tag 4 wiederholt. An den Tagen 0 und 1 wurden alle Gruppen bis auf eine mit LF behandelte Gruppe mit DNFB sensibilisiert. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Allergie. 24 h später wurden die Ohren entnommen und Epidermal Sheets angefertigt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit anti-MHC II-Antikörpern.

In Abb. 48 A-F sind Fotografien der Präparate dargestellt.

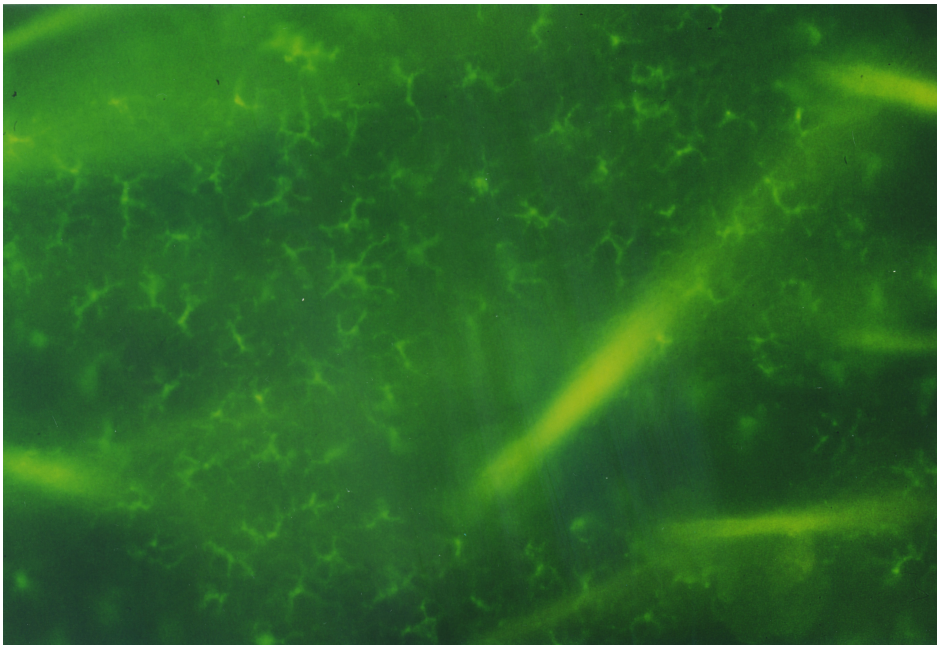


Abb. 48 A

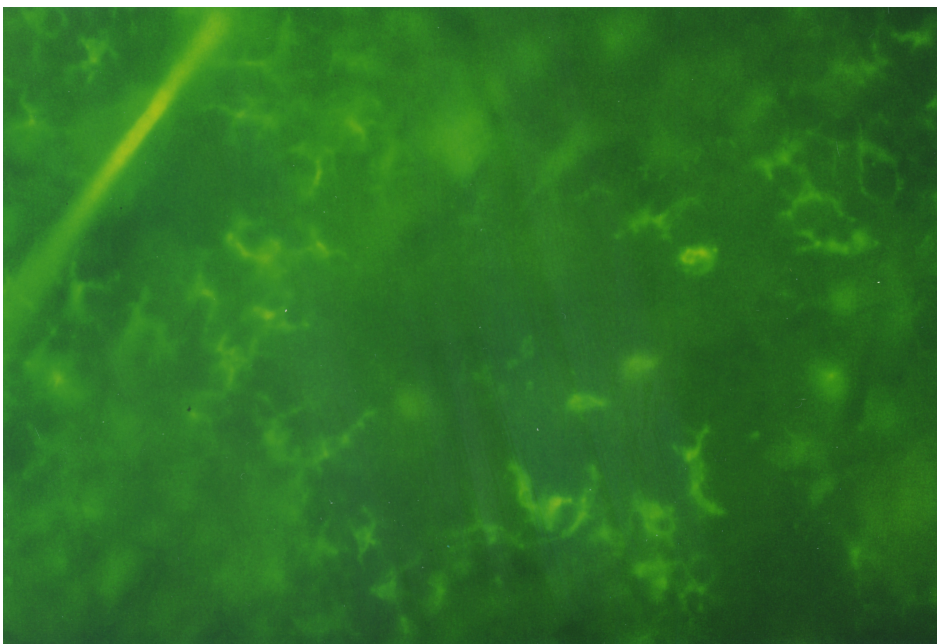


Abb. 48 B

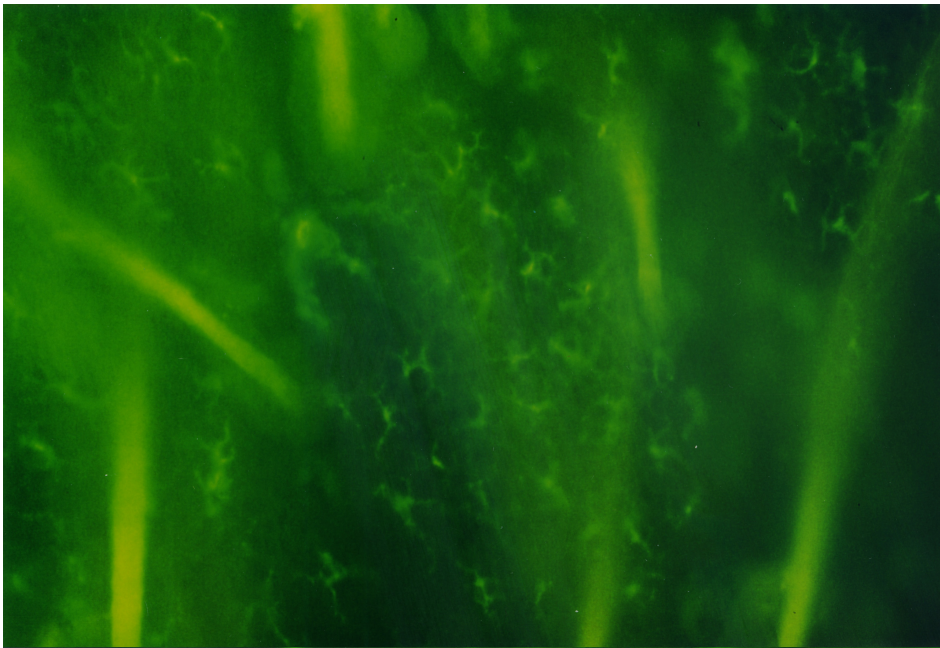


Abb. 48 C

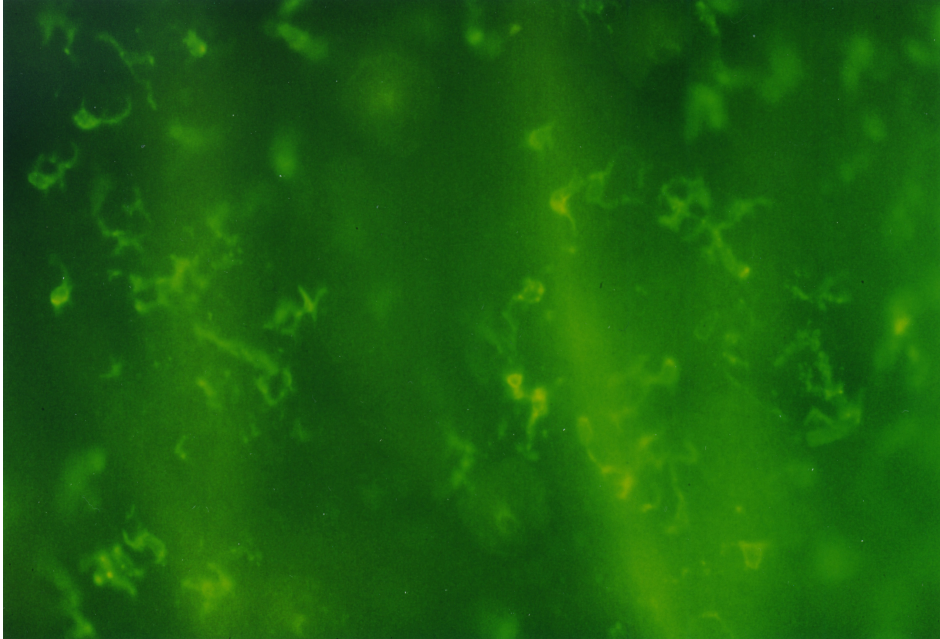


Abb. 48 D

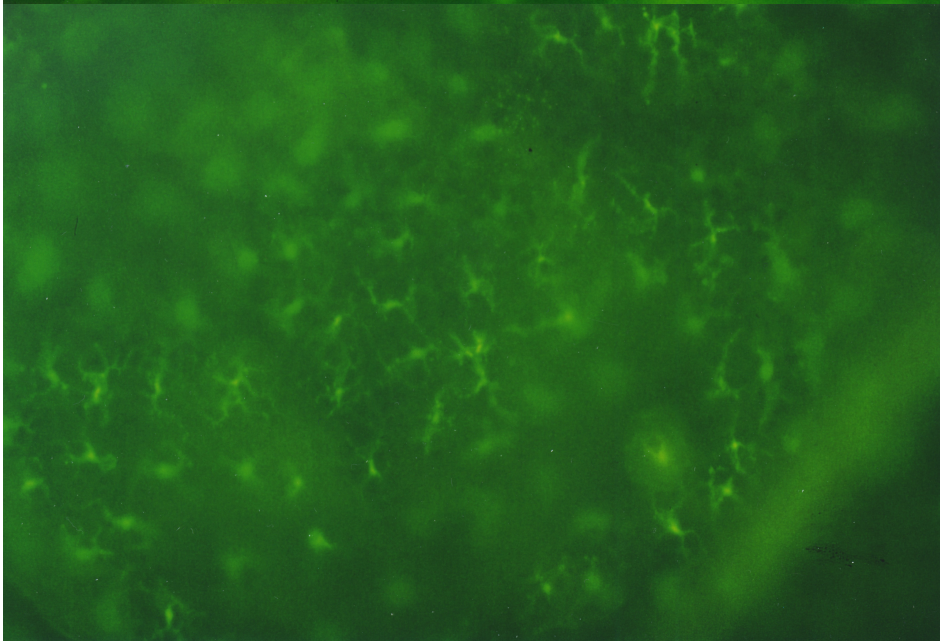


Abb. 48 E

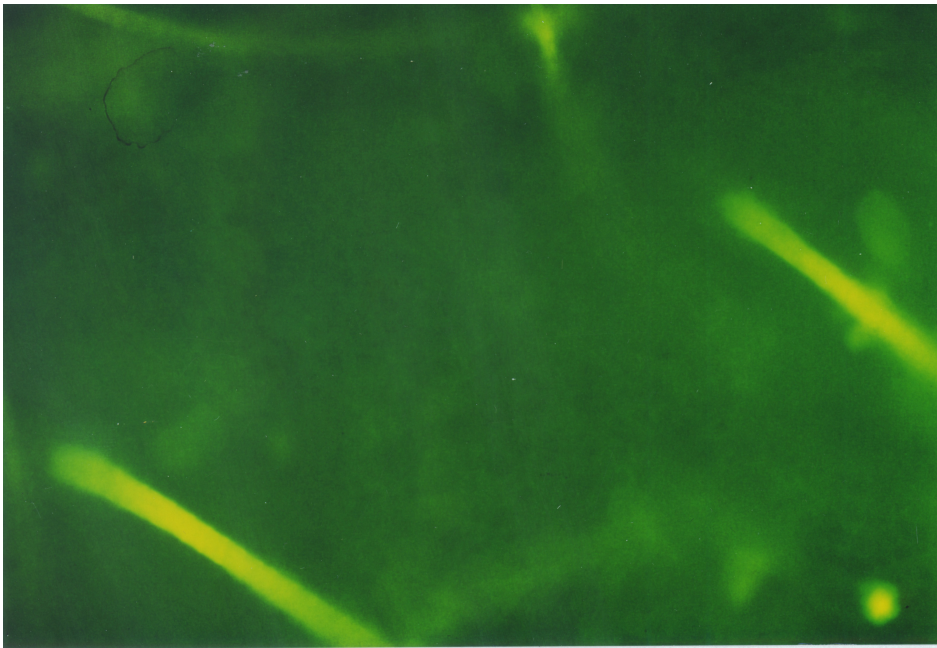


Abb. 48 F

Abb. 48 Histologische Untersuchungen von Langerhans-Zellen bei Leflunomid-behandelten Mäusen unter dem Einfluß von DNFB

An diesem Experiment nahmen zwei Gruppen von Mäusen teil. Während einer Gruppe 40 mg/kg LF oral verabreicht wurde, bekam die zweite Gruppe zwecks Kontrolle 1% CMC appliziert. Am Tag -1 erfolgte die Applikation von LF sowie 1% CMC, und dieser Vorgang wurde alle 24 h bis zur Auslösung der Kontaktallergie wiederholt. Die Auslösung der Kontaktallergie erfolgte bei allen Gruppen durch Auftragen von jeweils 25 µl 0,5% DNFB (Aceton/Olivenöl-Gemisch) auf das Abdomen an den Tagen 0 und 1. Am Tag 4 erfolgte die Auslösung der Kontaktallergie durch Auftragen von 10 µl 0,2% DNFB (Aceton/Olivenöl) auf das jeweils rechte Ohr der Tiere. Nach der Auslösung wurden die Ohren getrennt entnommen und Epidermal Sheets angefertigt. Die Präparate wurden mit anti-MHC II-Antikörpern (2G9-ÜS) inkubiert und die MHC-II-Färbung mit Maus-anti-Ratte^{DTAF}-Antikörpern sichtbar gemacht. Die Epidermal Sheets wurden bei einer Vergrößerung von 200x fotografiert.

Abb. 48A zeigt die MHC II-Färbung bei 1%CMC-behandelten Mäusen

Abb. 48B zeigt die MHC II-Färbung bei 1%CMC-behandelten Mäusen, die mit DNFB konfrontiert worden waren

Abb. 48C zeigt die MHC II-Färbung bei 40 mg/kg-behandelten Mäusen

Abb. 48D zeigt die MHC II-Färbung bei 40 mg/kg-behandelten Mäusen, die mit DNFB konfrontiert worden waren

Abb. 48E zeigt die MHC II-Färbung bei unbehandelten Mäusen

Abb. 48F zeigt die Isotyp-Färbung bei unbehandelten Mäusen

In den Abbildungen A, C und E sind MHC II-positive Langerhans-Zellen zu erkennen. Die Zellen liegen in einem gleichmäßigen Verteilungsmuster vor, und man kann deutlich die dendritische Morphologie erkennen. Es ließen sich keinerlei Strukturveränderungen der Langerhans-Zellen zwischen LF-behandelten und CMC-behandelten Mäusen feststellen. Durch den Kontakt mit DNFB im Zuge einer Kontaktallergie lösen sich einzelne Langerhans-Zellen aus dem Verteilungsverband und migrieren in die Lymphknoten (Abb. 48 B und D). Die verbliebenen Langerhans-Zellen weisen einen deutlich vergrößerten Zellkörper auf. Eine verstärkte Expression von MHC II-Molekülen auf den Zellen ist aufgrund der höheren Intensität der Färbungen zu beobachten. Die Langerhans-Zellen aus LF-behandelten Mäusen weisen keine Unterschiede zu den Langerhans-Zellen aus CMC-behandelten Mäusen auf, so daß daraus geschlossen werden kann, daß die Applikation von LF auf das morphologische Erscheinungsbild von Langerhans-Zellen keinen Einfluß hat.

9 Migration von Langerhans-Zellen aus LF-behandelten Mäusen

Als ein möglicher Grund für die Inhibition der Schwellungsreaktion bei einer Kontaktallergie durch LF könnte eine Störung der Migrationsfähigkeit der epidermalen LC in Frage kommen, zumal, wie aus der Literatur zu entnehmen ist, A77 1726 auch die Expression von TNF- α beeinträchtigen soll. Da TNF als Signal für die Auswanderung der LC in die drainierenden Lymphknoten angesehen wird, ist zu vermuten, daß die LC durch das Fehlen von TNF- α nicht mehr migrieren konnten. Diese Vermutung liegt nahe, da bei der Präparation der cervikalen Lymphknoten von LF-behandelten Tieren, die mit DNFB sensibilisiert worden waren, keine vergrößerten Lymphknoten im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet wurden.

Um die Frage zu klären, inwieweit die Migrationsfähigkeit der LC durch LF beeinträchtigt wird, wurde folgendes Experiment (Abb. 49) durchgeführt:

Einer Kontrollgruppe und einer Gruppe, die an den Tagen 0, 1 und 2 LF erhielt, wurde am Tag 2 FITC auf das jeweils rechte Ohr appliziert. 24 h später wurden den Tieren die cervikalen Lymphknoten und die Milz zwecks Kontrolle entnommen und die Zellen auf eine FITC- bzw. MHC II-Färbung im FACS analysiert. Anhand der prozentualen Verteilung der FITC⁺- und MHC II⁺-Zellen konnten Rückschlüsse auf die Migration der LC gewonnen werden. Der Einsatz der Milzzellen diente zur Kontrolle, da sie keine FITC-Färbung im FACS aufwiesen. Der Versuch ist in Abb. 49 grafisch dargestellt.

In diesem Experiment wurde die Einstellung der Fluoreszenz im Kanal 1 mit Hilfe der Milzzellen, die FITC-negativ sind, vorgenommen. Die Fluoreszenz im FL3-Kanal wurde mit dem Isotyp Ratte IgG2a eingestellt. Für die MHC II-Färbung kam der Ratten-Antikörper 2G9 zur Anwendung.

In beiden Versuchsgruppen waren FITC- und MHC II-doppelt-positive Zellen in den drainierenden Lymphknoten zu sehen, was auf eine Migrationsfähigkeit der LC aus der Haut hinweist. Der prozentuale Anteil der MHC II-positiven Zellen in den Lymphknoten war bei den LF-behandelten Tieren geringfügig höher als bei der Kontrollgruppe, die mit CMC gefüttert worden war. Aufgrund des geringen Unterschiedes kann von keiner besseren Migrationsfähigkeit der LC von LF-behandelten Mäusen gesprochen werden. Die Tatsache, daß FITC-tragende Zellen, die gleichzeitig MHC II positiv sind, sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der mit LF behandelten Gruppe auftraten, läßt auf eine ungestörte Migrationsfähigkeit der Langerhans-Zellen schließen.

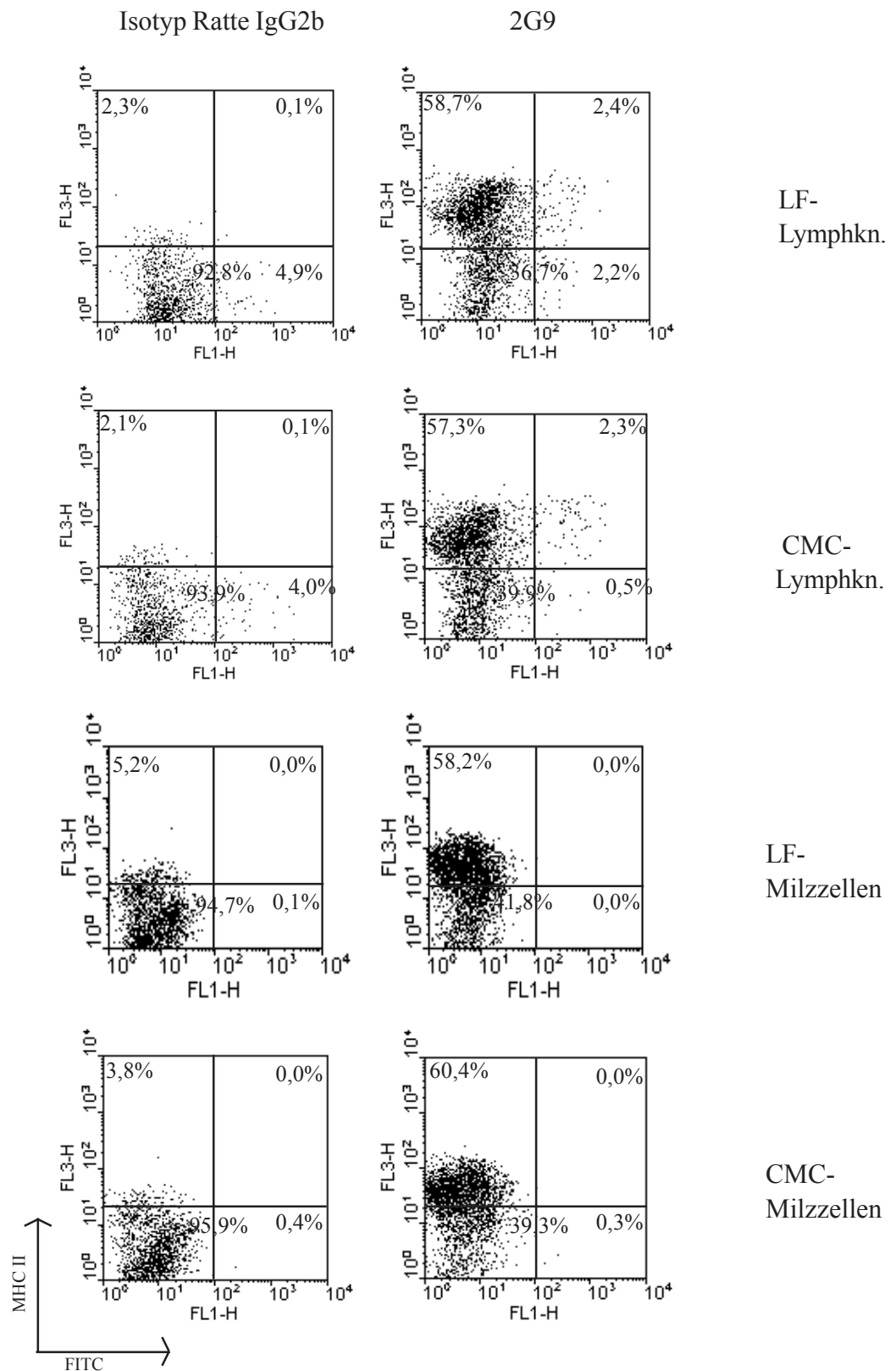


Abb. 49 Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit von Langerhanszellen von LF-behandelten Mäusen

An diesem Versuch nahmen zwei Gruppen von je drei BALB/c Mäusen teil. Die Tiere wurden dreimal alle 24 h mit 1% CMC oder 40 mg/kg LF gefüttert. Am dritten Tag wurden je Ohrseite 10 µl FITC-Lösung (0,2 mg in Aceton/Dibutylphthalsäure) aufgetragen. 24 h später wurden die cervikalen Lymphknoten und die Milz entnommen und die Zellen entsprechend gefärbt. Der Antikörper 2G9 bindet an I-A^d-Moleküle und wurde mit einem Ziege-anti-Ratte^{biotin} sowie Streptavidin-Quantum Red nachgewiesen.

10 Einfluß von A77 1726 auf den T-Zellklon D10.G4.1

Um die inhibitorische Wirkung von LF bei der kontaktallergischen Reaktion weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluß von LF auf T-Zellen untersucht. Dazu wurde der in unserem Labor verwendete Th2-Zellklon D10.G4.1 eingesetzt. Die Zellen wurden für 12 h mit drei verschiedenen Dosen des aktiven Metaboliten A77 1726 kultiviert und mit Antikörpern gefärbt. Die Cytometrieuntersuchungen sind in Abb. 50 dargestellt.

Vergleicht man die Expression des Transferrin-Rezeptors innerhalb der vier Gruppen, so läßt sich eine Reduktion von 77,6% auf 54, 50,3 bzw. 61,5% bei den LF-kultivierten Zellen feststellen. Die Expression des IL-2 Rezeptors wurde durch LF von 74,6% bei den unbehandelten Zellen auf 52,1, 43,3 bzw. 46,3% bei den LF-behandelten Zellen herunterreguliert. Selbst CD44 erfuhr eine Reduktion von 74,8% auf 53,8, 54,4 bzw. 54,6%. Es konnte keine Abhängigkeit der Expressionsstärke von der verwendeten LF-Konzentration festgestellt werden. Offenbar wirkte LF schon in der eingesetzten geringsten Konzentration von 270 μM auf die Reduktion der Oberflächenmoleküle, so daß die mehr als 2,5-fache Konzentration keine weitere Inhibition der Oberflächenexpression mehr bewirken konnte.

Bei der Betrachtung der mittleren Fluoreszenz-Werte (Mean-Fluorescence) konnte im Gegensatz zu den Werten der Transferrin-Rezeptoren und der CD44-Rezeptoren eine leichte Erhöhung der mittleren Fluoreszenz der IL-2 Rezeptoren bei den Zellen, die mit 270 μM (1292,2) und 405 μM A77 1726 (1054,1) kultiviert worden waren, festgestellt werden. Die mit 608 μM A77 1726 (805,5) kultivierten Zellen, wiesen im Vergleich zu den Zellen ohne LF- Kultivierung (810,7), keine Erhöhung des mittleren Fluoreszenz-Wertes auf. Die Erhöhung des mittleren Fluoreszenzwertes spricht für eine zunehmende Dichte des IL-2 Rezeptors auf den untersuchten Zellen.

Bei der Kultur der Zellen mit LF wurde bei jeder FACS-Messung eine Propidiumjodid-Färbung durchgeführt, um den Anteil der toten Zellen zu bestimmen. Es ergaben sich für den in Abb. 50 dargestellten Versuch 10,7% tote Zellen, ohne daß A77 1726 hinzugefügt worden war. Bei Zugabe von 270 μM A77 1726 für 12 h verringerte sich der Anteil der toten Zellen auf 5,2%. Durch Zugabe von 405 μM bzw. 608 μM A77 1726 konnten 4,3 bzw. 6,5% tote Zellen ermittelt werden. Ähnliche prozentuale Verteilungen ergaben sich bei anderen Versuchen. Offenbar wirkt A77 1726 auch bei höheren Konzentrationen nicht toxisch.

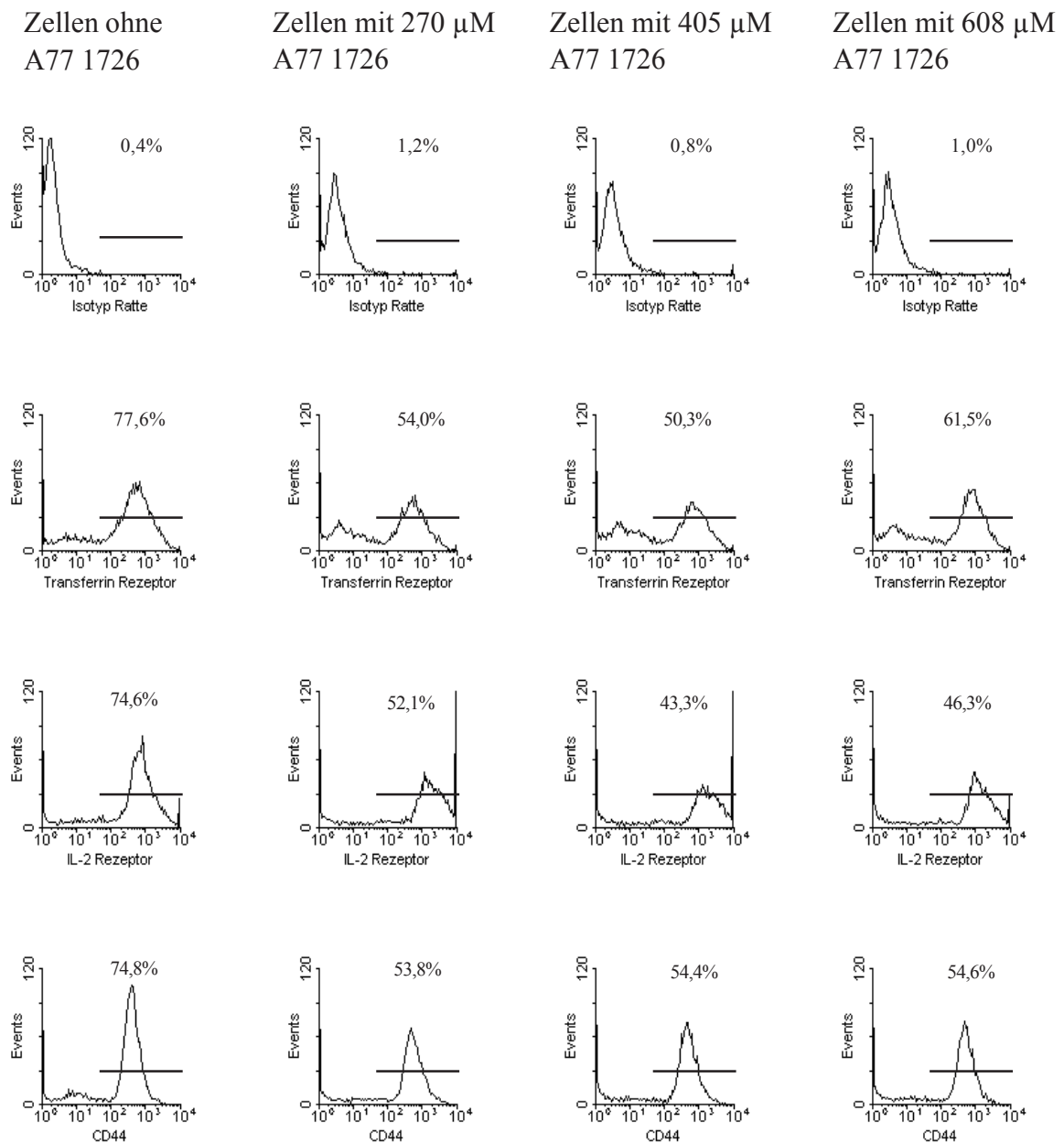


Abb. 50 Einfluß von LF auf die Expression von Transferrin-Rezeptor, IL-2 Rezeptor und CD44 beim T-Zell Klon D10.G4.1

Bei diesem Experiment wurden D10.G4.1 Zellen für 12 h mit 270, 405 und 608 μ M A771726 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit den Antikörpern gefärbt. Die Rattenantikörper wurden mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte^{bio} und dann mit Streptavidin-FITC nachgewiesen. Es wurden für die Messung die Propidiumjodid-positiven Zellen ausgewertet.

11 Topische Applikation von LF

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Ansatz wurde eine vereinfachte Applikationsform des Wirkstoffs LF getestet.

In nachfolgendem Experiment wurde deshalb der Metabolit A77 1726 (MW: 292,2) von Leflunomid direkt in Aceton/Olivenöl (4:1) gelöst und zusammen mit DNFB aufgetragen. Als Konzentration von A77 1726 wurden gemäß den Angaben von Dr. R. R. Barlett, Hoechst Marion Roussel AG, Werk Kalle-Albert, Wiesbaden, 100 μ M verwendet. Das entsprechende Experiment ist in Abb. 51 dargestellt.

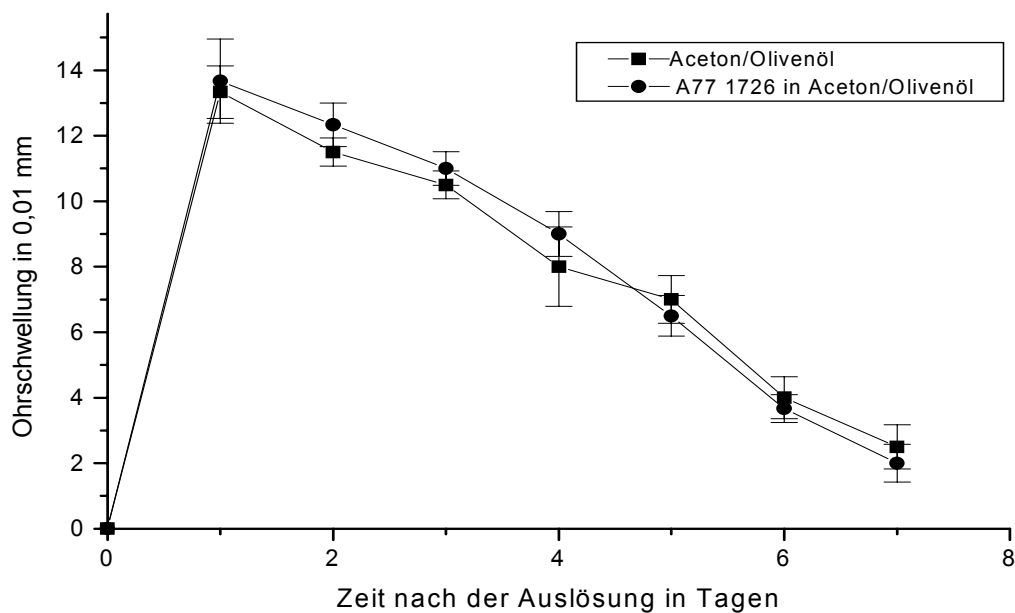


Abb. 51 Schwellungsverlauf einer CHS bei lokaler Applikation des Metaboliten A77 1726 in Aceton/Olivenöl

Bei diesem Experiment wurde der Metabolit A77 1726 in Aceton/Olivenöl (4:1) gelöst und zusammen mit DNFB aufgetragen. Die Tiere wurden an den Tagen 0 und 1 mit 25 μ l 0,5% DNFB und am Tag 4 mit 10 μ l 0,2% DNFB auf den jeweils rechten Ohrseiten behandelt. A77 1726 (0,1 mM) wurde in Aceton/Olivenöl gelöst und auf beide Ohren der entsprechenden Tiere gegeben. Die Behandlung der Tiere mit A77 1726 erfolgte an den Tagen -1 bis 3 auf dem Abdomen und am Tag 4 auf den Ohren. Die Kontrollgruppe erhielt kein A77 1726. An diesem Versuch nahmen zwei Gruppen von 6 BALB/c Mäusen teil.

Der Schwellungsverlauf erreichte am Tag 1 den maximalen Wert. Danach nahm die Schwellung kontinuierlich bis zum Tag 7 ab. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit A77 1726 behandelten Gruppe festgestellt werden. Anscheinend zeigt Leflunomid bzw. A77 1726 als lokale Applikationsform bei der CHS keine supprimierende Wirkung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Leflunomid, lokal appliziert, nicht in der Lage zu sein scheint, eine Kontaktallergie zu inhibieren.

IV. Diskussion

4.1 Diskussion zu Bedeutung von TNF bei der Kontaktallergie

Dendritische Zellen als professionelle APC sind für die Aktivierung von naiven T-Zellen und die Initiation von primären Immunantworten zuständig (69,70). Sie sind in den Organen wie Haut, Darm, Genitaltrakt, Lunge, Herz und Nieren lokalisiert. DC stammen von MHC II-negativen CD34-positiven Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und entwickeln sich im nicht-lymphoiden Gewebe zu MHC II-positiven Zellen mit der Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Wichtige Merkmale der DC sind ihre Beweglichkeit und Migrationsfähigkeit. Als Reaktion auf eine Infektion, ein Eindringen von toxischen Chemikalien oder eine Gewebsnekrose können inflammatorische Mediatoren diese DC zur Wanderung über die afferenten Lymphbahnen und/oder Blutgefäße in die sekundären lymphoiden Gewebe bewegen, wo sie prozessiertes Antigen den T-Zellen präsentieren. In der Haut befindliche DC umfassen epidermale LC und dermale DC. LC sind die hauptsächlich in der Haut vorkommenden APC. Es konnte gezeigt werden, daß einige Stimuli wie die Konfrontation mit einem Hapten, UVB-Bestrahlung und Transplantation von allogener Haut die LC zur Migration in die regionalen Lymphknoten stimulieren. Die molekularen Ereignisse, die diese LC-Migration auslösen, sind jedoch noch unbekannt. Einige Theorien schreiben Adhäsionsmolekülen (LFA-1, ICAM-1, E-Cadherin und CD44) und Cytokinen (IL-1 β und TNF- α) einen gewissen Einfluß auf die Wanderung der LC zu.

TNF- α als wichtigstes proinflammatorisches Cytokin konnte in Experimenten als Stimulus für die DC-Migration von nicht-lymphoiden Geweben wie Lungenepithel, Mukosa, Haut, Herz und Niere in die sekundären lymphoiden Gewebe nachgewiesen werden. Intradermale Injektionen von TNF- α in Mäusen führen zu einer Verringerung der LC in der Haut und zu einer Zunahme der DC in den drainierenden Lymphknoten (80,81). Die systemische Gabe von TNF- α führte zu einer Zunahme von MHC II-positiven DC in der Epidermis sowie in Herz und Nieren. Neutralisierende Antikörper gegen TNF inhibierten die Migration von epidermalen LC bei einer kontaktallergischen Reaktion und UVB-Bestrahlung.

Die Funktionen von TNF- α werden mit Hilfe der beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 ermöglicht, wobei für jeden Rezeptor spezifische Funktionen gefunden wurden (195). Bislang gab es nur einige Untersuchungen an humanen Langerhans-Zellen bezüglich der Expression der TNF-Rezeptoren (196,197). Auf humanen Langerhans-Zellen konnte nur der TNFR2 identifiziert werden. In einigen Publikationen konnte nur indirekt auf die Expression des TNFR2 auf murinen LC geschlossen werden (198-200). Es wurde vermutet, daß der TNFR2 als Hauptrezeptor für TNF auf den LC die Funktion des Migrationsstimulus bei einer CHS übernimmt und daß murine LC keinen TNFR1 besitzen. Weiterhin sollten Keratinozyten nur den TNFR1 und nicht den TNFR2 exprimieren.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluß von TNF- α bei einer kontaktallergischen Reaktion untersucht. Hierbei kamen TNF-Rezeptor 1- und TNF-Rezeptor 2-defiziente Mäuse sowie die entsprechenden Kontrollmäuse zum Einsatz.

Um den genauen Verlauf der Kontaktallergie studieren zu können, wurde der Ohrschwellungstest oder "mest" (mouse ear swelling test (189)) etabliert und das in der Forschungsliteratur häufig erwähnte Kontaktallergen DNFB sowie Oxazolone verwendet. Nachdem die Mäuse mit dem Kontaktallergen am Abdomen sensibilisiert worden waren, wurde das gleiche Kontaktallergen auf die Ohren appliziert. Die daraus resultierende Ohrschwellungsreaktion konnte mit Hilfe eines Mikrometers ermittelt werden, und die Schwellungswerte der Gruppen untereinander wurden anschließend verglichen (201).

Die grafische Analyse der Verlaufskinetik der Kontaktallergie mit DNFB bei TNFR1-defizienten- und Kontroll-Mäusen (Abb.1) stellte einen ähnlichen Schwellungsverlauf dar, wobei die Werte der TNFR1-defizienten Mäuse höher lagen als die Werte der Kontrollmäuse. Aufgrund der statistischen Überprüfung der Schwellungswerte bestand im Meßpunkt Tag 2 eine abgesicherte Überreaktivität der TNFR1-defizienten Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen.

Dieses Ergebnis konnte auch von Kondo et al. ermittelt werden (202). In ihrer Studie wurden die Tiere auch mit DNFB als Kontaktallergen behandelt, obgleich beim Ohrschwellungstest etwas unterschiedlichere DNFB-Dosen verwendet wurden.

Weiterhin wurde der Ohrschwellungsverlauf TNFR2-defizienter Mäuse im Zusammenhang mit einer kontaktallergischen Reaktion mit DNFB untersucht (Abb.2). Die TNFR2-defizienten Mäuse wiesen eine Überreaktivität gegenüber den Kontrollmäusen auf. Durch die statistische Überprüfung konnte die signifikant unterschiedliche Schwellungsreaktion der TNFR2-defizienten Mäuse bestätigt werden.

Ebenfalls eine überreaktive Schwellungsreaktion konnte bei den TNFR2-defizienten Mäusen, die mit dem Kontaktallergen Oxazolone konfrontiert worden waren, festgestellt werden (Abb.3). Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick kontrovers zu Wang (199), dessen TNFR2-defiziente Mäuse eine verminderte Reaktivität in bezug auf eine kontaktallergische Reaktion, ausgelöst durch Oxazolone, zeigten. In dieser Studie wurden die Tiere mit einer hohen Dosis Oxazolone (3%) sensibilisiert, und mit 1% Oxazolone wurde die Auslösung der Kontaktallergie bewirkt. Durch die Verwendung von einer derart hohen Dosis Oxazolone werden aber aufgrund der Untersuchungen von Bacci et al. (203) epidermale Langerhans-Zellen bereits geschädigt und nehmen nicht mehr an der kontaktallergischen Reaktion teil. Bei Abwesenheit funktioneller Langerhans-Zellen sind bei diesen Mäusen aufgrund des toxischen Effekts des Kontaktallergens an der kontaktallergischen Reaktion nur dermale APC beteiligt. Weiterhin deuten die niedrigen Ohrschwellungswerte der Studie von Wang et al. darauf hin, daß die Schwellungsreaktion nicht richtig induziert wurde, obwohl eine sehr viel höhere Dosis des Kontaktallergens eingesetzt wurde. Die Studie kann deswegen nicht als kontrovers eingestuft werden. Die Überreaktivität der Schwellungsreaktion spricht für eine immunosuppressive oder anti-inflammatorische Rolle von TNF- α bei einer kontaktallergischen Reaktion.

Mittels histologischer Charakterisierung epidermaler Langerhans-Zellen aus TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen konnte festgestellt werden, daß der fehlende TNF-Rezeptor 1 oder 2 keinen Einfluß auf die Differenzierung und Ausbildung der morphologischen Struktur der Langerhans-Zellen besitzt (Abb.4).

Eine Studie von Wang et al. (198) kommt in bezug auf die TNFR1-defizienten Mäuse zu gleichen Schlußfolgerungen. In dieser und einer weiteren Untersuchung konnten Wang et al. (199) bei TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen keine Unterschiede hinsichtlich der Dichte

der epidermalen Langerhans-Zellen feststellen und kamen zu dem Schluß, daß weder der TNFR1 noch der TNFR2 für die Rekrutierung der Langerhans-Zellen in der Epidermis notwendig ist.

Mit Hilfe von Proliferationstests (MELR) wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht, inwieweit die Stimulationsfähigkeit epidermaler APC durch das Fehlen der TNF-Rezeptoren betroffen sein könnte.

Bei den in der Arbeit angeführten Versuchen konnten keine Unterschiede zwischen Langerhans-Zellen aus TNFR1- bzw. TNFR2-defizienten Mäusen sowie Kontrollmäusen hinsichtlich ihrer Stimulationskapazität beobachtet werden. Im Verlauf der Versuche erwiesen sich die frischen Langerhans-Zellen als schlechtere Stimulator-Zellen im Vergleich zu kultivierten Langerhans-Zellen. Das funktionale Verhalten der isolierten epidermalen Zellsuspension stimmt mit den Literaturangaben überein. (55,204).

Der Grund für die Steigerung der Stimulationspotenz von kultivierten epidermalen Zellen mag zum einen in der verstärkten Expression von MHC II-Molekülen zu finden sein, zum anderen starben während der Kultivierung der epidermalen Zellen hauptsächlich Keratinozyten ab, so daß sich eine natürliche Anreicherung der Langerhans-Zellen ergab. Bei einer Auszählung von Cytospin-Präparaten ergab sich nach der Kultivierung eine Anreicherung von 8-10% Langerhans-Zellen gegenüber 3-5% bei frisch isolierten Epidermalzellen (Daten nicht gezeigt).

In mehreren Studien (204-206) konnte bereits nachgewiesen werden, daß Langerhans-Zellen in zwei verschiedenen funktionalen Formen existieren. Frisch isolierte Langerhans-Zellen sind zwar in der Lage, syngene und allogene T-Zellen schwach zu stimulieren; jedoch sind die kultivierten Langerhans-Zellen sehr viel bessere Stimulatoren. Kultivierte Langerhans-Zellen exprimieren, wie aus zahlreichen Publikationen zu entnehmen ist, eine bis zu 10-fache Menge an MHC II auf der Oberfläche (204). Es wird vermutet, daß kultivierte Langerhans-Zellen die *in vitro* Äquivalente derjenigen Langerhans-Zellen darstellen, die in die drainierenden Lymphknoten nach der Allergen-Applikation ausgewandert sind. Aus Arbeiten von M. Kripke (99) und S. Macatonia (103) ist bekannt, daß dendritische Zellen 24 Stunden nach Allergenapplikation verstärkt in regionalen Lymphknoten auftreten und dort Antigene präsentieren. Die Daten zeigten, daß *in vitro* kultivierte Langerhans-Zellen Ähnlichkeiten mit *in vivo* aktivierten Langerhans-Zellen in der Haut aufweisen und auch in der Lage sind, Alloantigene effizient zu präsentieren.

Desweiteren ist es wichtig, der Frage nachzugehen, weshalb kultivierte Langerhans-Zellen eine erhöhte MHC II-Expression aufweisen. Dies ist auf die Wirkung von GM-CSF zurückzuführen (73). Durch die Cokultur von Langerhans-Zellen zusammen mit epidermalen Zellen, vornehmlich Keratinozyten, wurde das für die Reifung der Langerhans-Zellen notwendige GM-CSF und eventuell weitere Differenzierungsfaktoren bereitgestellt. In einigen Arbeiten (204,207,208) konnte hinreichend gezeigt werden, daß frisch isolierte Langerhans-Zellen gute Stimulator-Zellen von Antigen-spezifischen T-Zell-Klonen waren, während Langerhans-Zellen aus Kurz-Zeit-Kulturen eine höhere Effizienz bei der allogenspezifischen Stimulation von T-Zellen zeigten. Dies war auf die verstärkte Expression von MHC II-Molekülen bei kultivierten Langerhans-Zellen zurückzuführen. Eine Neusynthese von MHC II-mRNA fand bei der Kultivierung der Langerhans-Zellen nicht statt (55).

Um den Einfluß der TNF-Rezeptoren bei der Wanderung der Langerhans-Zellen zu bestimmen, wurden Langerhans-Zellen von TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FITC untersucht. Dazu wurden die Tiere mit FITC sensibilisiert und die Langerhans-Zellen in den regionalen Lymphknoten der FITC-behandelten Ohren analysiert. Es konnten sowohl in den Lymphknoten der TNFR1- als auch der TNFR2-defizienten Mäusen Langerhans-Zellen, die FITC-positiv gefärbt waren, festgestellt werden. Die FACS-Analyse der TNFR1-defizienten Mäuse (Abb. 7) zeigte, daß die Anzahl der FITC-gefärbten Zellen, verglichen mit den Kontrollmäusen, nicht vermindert war. Offenbar scheint der TNFR1 für die Wanderung von Langerhans-Zellen nicht entscheidend zu sein. Anders ist es dagegen bei der Migrationsanalyse der TNFR2-defizienten Mäuse. Die Wanderung der FITC-positiven Zellen aus TNFR2-defizienten Mäusen ist im Vergleich zu den Kontrollmäusen reduziert. Dies spricht für einen Einfluß des TNF-Rezeptors 2 bei der Wanderung der Langerhans-Zellen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse erfahren Bestätigung in der Fachliteratur. So konnte auch von Wang et al. (198) festgestellt werden, daß TNFR1-defiziente Mäuse eine Migrationsfähigkeit von Langerhans-Zellen besitzen, die sich in keiner Weise von denen der Kontrollmäuse unterscheidet. In einer Studie von Wang et al. (199) konnte ebenfalls eine reduzierte Wanderung der Langerhans-Zellen aus TNFR2-defizienten Mäusen beobachtet werden.

Die FITC-induzierte Migrationsanalyse wird für *in vivo* Studien schon seit längerer Zeit verwendet (99,103,199), und das System erlaubt es, den gesamten Weg der Langerhans-Zellmigration – von der Epidermis bis zu den Lymphknoten - zu untersuchen. Jedoch ist als Kritikpunkt dieser Methode anzumerken, daß FITC ebenso in der Lage ist, durch die Epidermis zu der Dermis zu gelangen, um sich dort an dermale DC und andere APC zu binden. Aus diesem Grund kann man nicht ausschließen, daß einige FITC-gefärbte Zellen in den Lymphknoten dermale DC und andere APC sind. Es konnte jedoch in einigen früheren Arbeiten gezeigt werden, daß einige FITC-positive Zellen in den drainierenden Lymphknoten Birbeck Granula als spezifischen Marker für Langerhans-Zellen enthielten (99,103). Weiterhin konnte beobachtet werden, daß diese FITC-gefärbten Zellen in der Lage waren, *in vitro* eine T-Zellstimulation durchzuführen (103) und naive syngene Rezipienten gegenüber FITC zu sensibilisieren (99). Ferner wurde von Wang et al. (199) durch s.c. Injektion von FITC in Mäusen eine signifikant geringere Zahl der FITC-positiven Zellen in den Lymphknoten beobachtet als bei Mäusen, deren Ohren mit FITC behandelt worden waren.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, daß zumindest ein großer Teil der FITC-gefärbten Zellen in den Lymphknoten epidermale Langerhans-Zellen waren.

In einer Studie von Dekaris et al. (209) wurden ebenfalls TNFR1- und TNFR2-defiziente Mäuse für die Migration von cornealen Langerhans-Zellen verwendet. Dazu wurde in der normalerweise Langerhans-zellfreien Cornea von TNFR-defizienten Mäusen durch Verbrennungen oder/und durch ein Cytokin ein Stimulus gesetzt, der die Einwanderung von Langerhans-Zellen bewirkt. Durch Injektionen von TNF- α und IL-1 in die Cornea wurde so die Wirkung der Cytokine auf die Wanderung der Langerhans-Zellen getestet. Mit Hilfe dieses Modells konnte festgestellt werden, daß bei Abwesenheit der TNFR1 oder/und TNFR2 die Anzahl der eingewanderten Langerhans-Zellen nach Stimulation mit TNF- α oder durch Verbrennungen signifikant vermindert ist im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Autoren schließen daraus, daß sowohl der TNFR1 als auch der TNFR2 die Migration der Langerhans-Zellen induzieren. Außerdem konnte an diesem Versuchsmodell festgestellt werden, daß

TNF- α die LC-Migration in einer von IL-1 unabhängigen Weise ermöglicht, wie aus Experimenten mit IL-1RI-defizienten Mäusen geschlossen werden konnte. Gleichzeitig weisen die Forscher auch auf die Beschränkungen dieses von ihnen gewählten Versuchsmodells hin. Die Wanderung der cornealen Langerhans-Zellen unterscheidet sich insofern von der der epidermalen LC, als die cornealen LC horizontal (intraepithelial) und die epidermalen LC vertikal wandern (von der Dermis zur Epidermis und umgekehrt).

Eine der wichtigsten Fragen zur Beantwortung der Wirkung von TNF bei Langerhans-Zellen ist, welche TNF-Rezeptoren von Langerhans-Zellen exprimiert werden. Eine erste Untersuchung wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei Epidermal Sheets vorgenommen. Da mit den herkömmlichen Nachweissystemen keinerlei Färbungen außer den stark exprimierten MHC II-Molekülen zu erkennen waren, wurde eine fluoreszenzverstärkende Nachweis-Methode angewandt. Daraufhin konnten eine schwache Expression des TNFR1 und ein deutlicher Nachweis des TNFR2 beobachtet werden (Abb. 9). Da bei den Fluoreszenzfärbungen aufgrund der Signalverstärkung nur eine Einzelfärbung durchgeführt werden konnte, war es leider nicht möglich, einen direkten Nachweis der Langerhans-Zellen mit Hilfe einer MHC II-Färbung zu erbringen. Die dendritische Struktur der FITC-positiven Zellen ähnelt sowohl LC als auch DETC.

Um Aufschlüsse über die Expression von TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von murinen Langerhans-Zellen und Keratinozyten gewinnen zu können, wurden zytofluorometrische Analysen durchgeführt. In Vorversuchen konnte bei den Fibroblastenlinien L929 und WEHI 164 eine deutliche Färbung des TNFR2 nachgewiesen werden. Die Färbungen des TNFR1 waren jedoch nur in geringem Maße erkennbar. Damit konnte die Funktionalität zumindest des TNFR2-Antikörpers bestätigt werden. Deutlich ist die Färbung des TNFR2 ebenfalls bei den T-Zellklonen BK-OVA-1R und D10.G4.1 sowie der T-Lymphozytenlinie CTLL zu erkennen. Bei dem T-Zellklon D10.G4.1 konnte weiterhin der TNFR1 nachgewiesen werden. Weiterhin konnten beide TNF-Rezeptoren auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212 nachgewiesen werden. Zum spezifischen Nachweis der TNF-Rezeptoren auf Langerhans-Zellen war es erforderlich, sie anzureinigen, da sie nur in geringer Zahl in der Zellsuspension enthalten waren. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Annexin V- und MHC II-gekoppelten Beads eine Methode etabliert, um viable epidermale Langerhans-Zellen und Keratinozyten zu gewinnen. Die so gereinigten, frisch isolierten Langerhans-Zellen zeigten keine Expression beider TNF-Rezeptoren, während kultivierte Langerhans-Zellen den TNFR2 exprimierten. Sowohl frisch isolierte als auch kultivierte Keratinozyten wiesen keine Expression der TNF-Rezeptoren auf der Oberfläche auf. Bezüglich der Expression des TNF-Rezeptors 2 konnte im FACS zum ersten Mal gezeigt werden, daß kultivierte murine epidermale Langerhans-Zellen TNFR2 exprimieren.

Ryffel et al. (196) konnten durch immunhistochemische Färbungen von Cryoschnitten menschlicher Haut bei Langerhans-Zellen ebenfalls den TNFR2 nachweisen. In einer Studie von Larregina et al. (197) wurden frische und kultivierte humane Langerhans-Zellen untersucht. Der TNFR1 wird demnach weder bei frischen noch bei kultivierten LC exprimiert, während der TNFR2 bei frischen LC stärker als bei kultivierten LC exprimiert wird. Die Expression des TNFR1 auf humanen Keratinozyten war ebenfalls Thema der Untersuchungen von Trefzer et al. (210). Demnach exprimieren humane Keratinozyten nur den TNFR1.

Mittels RT-PCR-Technik konnte die mRNA nur für den TNFR1, nicht aber für den TNFR2 gefunden werden. In einer Untersuchung von Zhuang et al. (211) wurde kürzlich festgestellt, daß beide TNF-Rezeptoren auf murinen Keratinozyten exprimiert werden.

Die Tatsache, daß in dieser Arbeit der TNFR2 auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212 nachgewiesen wird und bei frisch isolierten oder kultivierten Keratinozyten nicht, kann zum einen auf eine geringe Expressionsdichte der Rezeptoren bzw. auf eine geringe Sensitivität der verwendeten Antikörper oder zum anderen auf Unterschiede zwischen kultivierten Zellen, Zelllinien und der *in vivo* Situation zurückgeführt werden. Die Dichte der TNF-Rezeptoren wird von 100 bis 10000 Molekülen pro Zelle angegeben, wobei der TNFR1 konstitutiv bei einer geringeren Expressionsdichte gebildet wird und der TNFR2 durch Stimuli wie LPS, Mitogene oder IL-2 hochreguliert werden kann (212). Die Sensitivität von FACS-Geräten wird laut Hersteller mit 1000 Molekülen angegeben (213).

Um auf einer sensitiveren Ebene die Frage der Expression von TNF-Rezeptoren klären zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit mRNA-Analysen epidermaler Zellen durchgeführt. Die Funktionalität der verwendeten Primerpaare für die TNF-Rezeptoren konnte durch den Nachweis der mRNA des TNFR1 und TNFR2 bei CTLL-Zellen erbracht werden. In der Zellsuspension frisch isolierter und kultivierter Epidermalzellen konnte die mRNA des TNFR1 und TNFR2 beobachtet werden. Wie anhand von zwei unterschiedlichen Primerpaaren zwecks Nachweis des TNFR1 gefunden werden konnte, exprimieren frisch isolierte Langerhans-Zellen und Keratinozyten TNFR1-mRNA (Abb. 22, 23). Ebenfalls konnte bei kultivierten Langerhans-Zellen die TNFR1-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 23). Die Expression von TNFR2-mRNA bei frisch isolierten oder kultivierten Langerhans-Zellen konnte dagegen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurde die Expression der mRNA von TNFR1 unter dem Einfluß des Kontaktallergens DNFB untersucht. Die TNFR1-mRNA wurde von Epidermalzellen der untersuchten Gruppen sowie der Kontrollgruppe während des gesamten Zeitraumes der Untersuchung exprimiert, wobei eine leichte Steigerung der mRNA-Menge nach 8 h zu beobachten war (Abb. 24). Die Expression der TNFR1 mRNA bei murinen Keratinozyten konnte auch bei Zhung et al. (211) mit Hilfe der RT-PCR-Technik festgestellt werden. Ebenso gelang den Forschern der Nachweis von TNFR2 mRNA in geringeren Mengen.

Bezüglich der Expression der TNF-Rezeptoren kann man davon ausgehen, daß der TNFR1 konstitutiv in geringen Mengen auf den meisten Zelltypen gebildet wird, während die Bildung des TNFR2 ausschließlich auf Zellen der hämatopoetischen Zelllinie beschränkt ist. Außerdem ist der TNFR2 nach Aktivierung von T- und B-Lymphozyten induzierbar (214).

Was die Detektierbarkeit der TNFR2-mRNA anbetrifft, so gibt es in einigen Publikationen Hinweise auf unterschiedliche Splicingformen der TNFR2 mRNA. Beispielsweise wurden einer frühen Studie von Lewis et al. (215) zufolge mit Hilfe der Northern-Blot-Technik bei murinen Fibroblasten zwei mRNA-Transkripte mit einer Größe von 3,6 kb und 4,5 kb ausfindig gemacht. Weiterhin wurden in Ratten Trachealzellen mittels Northern Blot-Analyse beobachtet, daß ein Transkript für den TNFR1 und drei Transkripte (3,2 kb, 4,1 kb und 5,1 kb) für den TNFR2 existieren (216). Northern-Blot-Analysen der TNF-Rezeptoren von verschiedenen murinen Zellen wie Mastzellen, Th2-Zellen, Pre-B-Zellen, Stromazellen und Milzzellen zeigten zwei mRNA Transkripte für den TNFR1 und ein Transkript für den TNFR2. Bei humanen Zelllinien konnten zwei verschiedene Größen von Transkripten für den TNFR1 und drei für den TNFR2 festgestellt werden (190). Im Rahmen dieser Arbeit wurden

bei Vorversuchen zur Etablierung der TNF-Rezeptor-RT-PCR bei Con A stimulierten Milz-Zellen ebenfalls verschiedene PCR-Produkte mit den Primern des TNFR2, die auf verschiedene mRNAs zurückzuführen sind, entdeckt (Daten nicht gezeigt).

Diese variablen Größen der mRNA-Transkripte erklären einige Autoren durch alternative Splicing Prozesse der originalen Transkripte. In einer Studie von Hurlé et al. (217) wurde das murine TNFR2-Gen kloniert, sequenziert und analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß das TNFR2-Gen aus 10 Exons mit einer Größe von 35 bp bis 2,6 kb und 9 Introns in einer Größenordnung von 322 bp bis 16 kb besteht. Auch hier konnten zwei verschiedene TNFR2 mRNAs von 3,2 kb und 4,1 kb durch Northern-Blot-Analysen gefunden werden, jedoch existieren keinerlei Hinweise auf ein alternatives Splicing in den codierenden Regionen. Bezüglich des Polyadenylierungssignals konnte bei humanen Zellen eine funktionelle Sequenz gefunden werden, nicht dagegen in der Maus. Die Autoren konnten weiterhin durch Hybridisierungsstudien den Gebrauch eines alternativen Polyadenylierungssignals in der untranslatierten Region von Exon 10 nachweisen. Wie in einer Studie von Fuchs et al. untersucht wurde (218), besteht das Gen des humanen TNFR1 ebenfalls aus 10 Exons wie alle Gene der TNF-Superfamilie.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare zum Nachweis des TNFR2 banden im Vorwärtsstrang an eine Sequenz, die im Exon 9 liegt. Die beiden zum Nachweis verwendeten Primer des gegenläufigen Stranges dagegen hybridisierten an Sequenzen im Exon 10 (siehe Anhang). Im Falle eines alternativen Splicens oder eines alternativen Polyadenylierungssignals könnte es möglich sein, daß das mRNA-Transkript nicht amplifiziert wurde, weil die mRNA sich im 3' Ende unterschied. Da aber mit Hilfe der FACS-Analyse bereits der Nachweis des TNFR2 auf der Oberfläche von kultivierten Langerhans-Zellen erfolgte, ist davon auszugehen, daß zumindest kultivierte Langerhans-Zellen TNFR2 in einer detektierbaren Anzahl exprimieren. Das Vorhandensein der TNFR1 mRNA bei kultivierten Langerhans-Zellen und die nicht erfolgte Färbung des Rezeptors in der FACS-Analyse sprechen für eine sehr geringe Expressionsdichte des TNFR1. Bezüglich der Expression der TNF-Rezeptoren bei frisch isolierten Langerhans-Zellen kann aufgrund der Existenz des TNFR1 mRNA-Transkripts und der nicht positiven Färbung im FACS ebenfalls von einer sehr geringen Expressionsstärke ausgegangen werden. Offen bleibt allerdings die Frage, ob frisch isolierte Langerhans-Zellen den TNFR2 auch nur in sehr geringer Dichte auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit unter die Nachweisgrenze des FACS-Gerätes fallen oder ob sie überhaupt keine TNFR2-mRNA bilden.

Es konnten im Laufe dieser Arbeit einige Fragen, was die Rolle von TNF- α und die TNF-Rezeptoren bei der kontaktallergischen Reaktion anbetrifft, geklärt werden.

Aufgrund der Ohrschwellungsversuche mit den TNFR-defizienten Mäusen konnte keine reduzierte Schwellungsreaktion bei einem der beiden Mäusestämme festgestellt werden, so daß eine CHS nicht allein auf einen Schlüsselrezeptor angewiesen ist. Vielmehr ist für die Auslösung einer allergischen Reaktion und damit die Migration von Langerhans-Zellen das epidermale Mikromilieu entscheidend. Es konnte in verschiedenen Modellsystemen TNF- α als ein Faktor bestimmt werden, der die Wanderung der Langerhans-Zellen induziert. Es gibt aber auch Hinweise, daß ebenso wie TNF- α auch IL-1 β in der Lage ist, LC zur Migration zu bewegen (219). Wie in einer Untersuchung von Cumberbatch et al. (220) festgestellt werden konnte, exprimieren 60% der murinen LC den IL-1RI und nur in geringem Maße IL-1RII. Murine Keratinozyten besitzen dagegen nur geringe Mengen des IL-1RI und IL-1RII auf der Oberfläche. In diesem Zusammenhang wird die Vermutung von einigen Forschern diskutiert, daß zuerst IL-1 β exklusiv von LC gebildet wird (221) und die TNF- α -Produktion von

Keratinocyten induziert (208). Cumberbatch et al. (220) sowie Dekaris et al. (209) vermuten, daß IL-1 β ein zweites, TNF- α -unabhängiges, Signal für die direkte Auswanderung der LC darstellt. IL-1 α wurde ebenfalls mit der Migration von LC in Zusammenhang gebracht (222). Weiterhin wurde von einigen Forschern IL-10 als regulatorisches Zytokin im Verlauf einer CHS untersucht. So wurden IL-10 suppressive Effekte bezüglich der Effektorphase bei CHS und DTH von Schwarz et al. (223) zugeschrieben. IL-10 war in dem verwendeten Versuchsmodell sogar in der Lage, die Induktion einer DTH, nicht aber einer CHS zu inhibieren. Es konnte von Wang et al. (224) IL-10 als ein Zytokin definiert werden, das einen suppressiven Effekt auf die Wanderung von LC besitzt. In IL-10 defizienten Mäusen war eine überreaktive Schwellungsreaktion bezüglich DNFB als Kontaktallergen sowie eine erhöhte Migrationsaktivität der LC in die Lymphknoten beobachtet worden. Demnach scheint in der Epidermis ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen zu existieren, das über die Migration der LC entscheidet. Bei Kontaktallergengabe produzieren epidermale Zellen pro-inflammatorische Cytokine und sorgen so für eine Verschiebung der Balance. Die Folge davon ist eine Auswanderung von LC in die Lymphknoten. In der Spätphase der Schwellungsreaktion werden dann anti-inflammatorische Cytokine gebildet, die die weitere Wanderung der LC inhibieren, und das Gleichgewicht wird wiederhergestellt.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein direkter Nachweis erfolgen, daß kultivierte LC den TNFR2 auf der Zelloberfläche exprimieren. Außerdem besitzen sie mRNA für den TNFR1, der aber nicht oder nur in sehr geringer Expressionsstärke gebildet wird. Es konnten beide TNF-Rezeptoren auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212 ermittelt werden. Vermutlich ist jedoch nicht der TNF-Rezeptor 2 allein verantwortlich für das Migrationssignal der LC. In der Studie von Dekaris et al. (209) waren beide TNF-Rezeptoren für eine Migration der cornealen LC verantwortlich. Bei den Untersuchungen von Wang et al. (198,199) konnte bei TNFR2-defizienten Mäusen eine nur reduzierte und keine komplette Inhibition der Wanderung der LC beobachtet werden. Ebenfalls eine reduzierte Schwellungsreaktion bezüglich des Kontaktallergens TNCB konnte bei IL-1 β -defizienten Mäusen beobachtet werden (225). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Schwellungsreaktion der TNFR2-defizienten Mäuse bzgl. des Kontaktallergens DNFB wies eine Überreaktivität auf. Dies alles spricht für einen alternativen oder einen weiteren, noch unbekanntem Weg der Signalübermittlung. Ein Kandidat für einen noch unerforschten Weg der Migrationsauslösung könnte ein weiterer unbekannter TNF-Rezeptor oder der TRANCE-Rezeptor (TNF-related activation-induced cytokine) sein. In einer Studie von Wong et al. (226) wurde dieser noch recht unbekannt Rezeptor auf reifen dendritischen Zellen gefunden. Die Funktion von TRANCE konnte bisher insoweit formuliert werden, daß er als ein Faktor zum Überleben von DC wichtig ist und die Kommunikation von T-Zellen und DC steuern kann (226,227). In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Josien et al. (228) konnte beobachtet werden, daß TRANCE in dendritischen Zellen die Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 und IL-6 sowie Cytokinen zur Differenzierung von T-Zellen wie IL-12 und IL-15 induziert.

4.2 Diskussion zur Wirkung von Leflunomid auf die Kontaktallergie

Leflunomid (LF) als Isoxazol Derivat besitzt immunstimulatorische und anti-inflammatorische Aktivitäten. LF teilt keine Verwandtschaft mit anderen existierenden immunsuppressiven Stoffen, und der Mechanismus der Immunsuppression ist noch nicht

geklärt. In früheren Studien wurde die Wirkung von LF auf DTH-Reaktionen wie adjuvante Arthritis getestet, die zusammen mit der kontaktallergischen Reaktion zur Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV gehören. In neuerer Zeit gibt es verstärkte Hinweise, daß eine CHS und eine DTH-Reaktion gegen Proteinantigene auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen.

Als wirkungsvollstes Mittel für eine Behandlung einer CHS werden gegenwärtig immer noch Derivate der Corticosteroide verwendet, die aufgrund von starken Nebenwirkungen die Suche nach günstigeren Behandlungsmethoden forcieren. Im Hinblick darauf wurde die Wirkung von LF auf eine kontaktallergische Reaktion am murinen System getestet.

Da zunächst keinerlei Hinweise auf eine Wirkungsweise von LF bei einer kontaktallergischen Reaktion bestanden, wurden in einem ersten Experiment zwei verschiedene Konzentrationen von LF getestet. Es konnte gezeigt werden, daß LF bei einer Kontaktallergie inhibitorisch wirkt. Eine nahezu vollständige Inhibition war bei der höheren LF-Dosis zu beobachten und konnte durch eine statistische Überprüfung als signifikant unterschiedlich bestätigt werden (Abb. 26).

Weiterhin wurde der Zeitraum der inhibitorischen Wirkung von LF in der Arbeit untersucht. Dazu wurden Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der bereits bekannten inhibitorischen Reaktion bei einer Kontaktallergie mit DNFB erneut mit dem Kontaktallergen konfrontiert, und anschließend wurde die Schwellungsreaktion gemessen. Ein inhibitorischer Effekt von LF war auch nach insgesamt 119 Tagen zu beobachten.

Durch die wiederholte Auslösung der Kontaktallergie mit DNFB wurden neue T-Zellen durch einen Erstkontakt mit dem Kontaktallergen sensibilisiert, was sich in einem Anstieg der Schwellungsreaktion bei der Kontrollgruppe manifestierte. Dieser zahlenmäßige Anstieg der *de novo* sensibilisierten T-Zellen wirkte sich aber nicht auf die Schwellungswerte der Leflunomid-behandelten Gruppe aus, was durch Suppression oder durch die Aktivierung beteiligter Suppressorzellen erklärt werden könnte.

Die Untersuchungen der inhibitorischen Wirkung von LF beschränkten sich nicht nur auf den Einsatz des oft verwendeten DNFB als Kontaktallergen sondern auch auf Oxazolone. Auch bei Verwendung des Kontaktallergens Oxazolone konnte die LF-induzierte Inhibition der Schwellungsreaktion im Zuge einer kontaktallergischen Reaktion bestätigt werden. Die im Versuchsmodell mit Oxazolone als Kontaktallergen für eine komplette Inhibition der Schwellungsreaktion benötigte geringere Konzentration von LF, im Vergleich zum Modell mit DNFB als Kontaktallergen, spricht für einen effektiveren Wirkmechanismus von LF bei einer Oxazolone-induzierten Schwellungsreaktion.

Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung der Wirkung von LF war, ob LF eine inhibitorische Wirkung auch bei einer irritativen Reaktion zeigt, die von einer Kontaktallergie abgegrenzt werden kann (88). Obgleich eine Kontaktallergie und eine irritative Reaktion vermutlich durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, besitzen sie nicht nur gleiche histopathologische Merkmale (229,230) sondern auch identische Zellfiltrate (231). Für eine irritative Schwellungsreaktion wurde Oxazolone in einer hohen Konzentration ohne vorherige Sensibilisierung eingesetzt (Abb. 31). Tatsächlich konnte in diesem Versuch die inhibitorische Wirkung von LF bei der irritativen Reaktion bestätigt werden.

In einem weiterem Experiment wurde die antigen-spezifische Wirkung von LF beobachtet (Abb. 33). Nach einem anfänglichen Schwellungsverlauf mit DNFB als Kontaktallergen wurden die Tiere erneut mit DNFB oder einem Irritans - in diesem Falle einer hohen Dosis von Oxazolone – behandelt. Die inhibitorische Wirkung von LF konnte nach der zweiten Behandlung mit DNFB erneut beobachtet werden. Der Kontakt mit dem Irritans bewirkte eine starke Schwellungsreaktion, wobei allerdings etwas geringere Schwellungswerte bei der LF-Gruppe zu beobachten waren. Es konnte jedoch keine vollständige Inhibition der Schwellungen bewirkt werden. Es hat also den Anschein, als wirke LF nicht vollständig antigenspezifisch.

Eine weitere wichtige Fragestellung ist die nach dem Wirkungszeitpunkt von LF bei der Sensibilisierungsreaktion. In dieser Arbeit wurde in einem Experiment LF nach der Auslösung der Schwellungsreaktion appliziert (Abb. 35), und es konnte keine inhibitorische Wirkung beobachtet werden. Offenbar wirkt LF nicht inhibitorisch auf eine bereits eingetretene Kontaktallergie. In einem nachfolgenden Experiment (Abb. 37 und 38) wurden Mäuse mit LF jeweils um einen Tag zeitversetzt, beginnend vor der Sensibilisierungsreaktion, bis zur Auslösungsreaktion behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß es für eine vollständige Inhibition der Schwellungsreaktion wichtig ist, daß LF bereits vor dem ersten Kontakt mit DNFB gegeben wurde. Je später LF in der Sensibilisierungsreaktion eingesetzt wurde, desto weniger inhibitorisch wirkte LF auf die Schwellungsreaktion. Wurde dagegen LF nach der Auslösungsreaktion appliziert, konnten keinerlei Inhibitionseffekte beobachtet werden. Auch nach wiederholter Auslösung der Schwellungsreaktion mit DNFB nach 21 Tagen zeigte sich ein vergleichbares Bild. Ebenfalls wiesen die Gruppen, die LF während der Sensibilisierungsphase erhielten, die niedrigsten Schwellungswerte auf. Anscheinend wirkt LF beim Priming von T-Zellen während der Sensibilisierungsphase der kontaktallergischen Reaktion inhibitorisch. Überhaupt keinen inhibitorischen Effekt auf die Schwellungsreaktion hatte LF, wenn es nach der Auslösung appliziert wurde. Da sich schon vor der Gabe von LF genügend geprimte T-Zellen gebildet hatten, konnte LF keinen größeren Effekt mehr auf die Schwellungsreaktion bewirken.

Gegenstand weiterer Untersuchungen war außerdem die Frage nach dem Zeitpunkt der Gabe von LF vor der Sensibilisierung mit dem Kontaktallergen. Es konnte in einem Experiment (Abb. 39) keinerlei supprimierender Effekt von LF auf die Schwellungsreaktion beobachtet werden, wenn es vor der Sensibilisierung mit DNFB gegeben wurde. Es ist also für die Wirkung von LF wichtig, daß LF während der Sensibilisierungsphase gegeben wird.

Zur näheren Charakterisierung der suppressiven Wirkung von LF gehörte auch die Übertragbarkeit der Suppression auf naive Tiere. Zu diesem Zweck wurde ein adoptiver Zelltransfer (232,233) in der Art durchgeführt, daß Mäuse LF während der Sensibilisierungsphase appliziert bekamen und eine Schwellungsreaktion ausgelöst wurde. Danach wurden Milz und Lymphknoten entnommen und als Einzelzellsuspension i.v. in naive Tiere transferiert. Dann erfolgte die Sensibilisierungsreaktion. 24 h nach der Auslösung der Schwellungsreaktion konnte eine Inhibition der Schwellungsreaktion in den Rezipienten beobachtet werden (Abb. 42A). Auch bei Betrachtung der Schwellungskinetik (Abb. 42B) kann eine Suppression der Schwellungsreaktion bei den Rezipienten, die Zellen von LF-behandelten Tieren übertragen bekamen, beobachtet werden. Durch statistische Überprüfung der Schwellungswerte mit dem Student t-Test konnte der signifikante Unterschied der Schwellungswerte belegt werden. Die Inhibition der Schwellungsreaktion ist also durch den

Transfer von immunkompetenten Zellen übertragbar. Dies spricht für ein Modell, wonach LF die Generierung von suppressiven Zellen bewirkt, deren suppressive Wirkung auch nach dem Transfer in naive Mäuse weiterhin anhält.

Für eine bessere Charakterisierung der suppressiv wirksamen Zellen wurde ein adoptiver Transfer mit $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ - depletierten Zellen durchgeführt. Auch hier ließen sich immunkompetente Zellen übertragen, die eine fast vollständige Inhibition der Schwellungsreaktion bewirkten (Abb. 46A und B).

Die Gruppe, die $CD4^+$ -depletierte Zellen übertragen bekam, konnte deutlich hinsichtlich der Schwellungswerte von der CMC-Gruppe unterschieden werden. Dies weist auf einen Einfluß der $CD8^+$ Zellen hin. Weil keine Zellpopulation angereichert, sondern depletiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere Zelltypen wie $CD4^- CD8^-$ T-Zellen auch eine Rolle bei der Suppression spielen.

Nach einem Zeitraum von 168 Tagen wurden die Tiere erneut mit DNFB konfrontiert, und die Schwellungsreaktion wurde gemessen. In diesem Experiment konnte auch nach so langer Zeit eine reduzierte Schwellungsreaktion der Gruppe, die Zellen von LF-behandelten Donoren bekam, beobachtet werden. Auch konnte noch der Einfluß der $CD4^+$ -depletierten Zellen von LF-behandelten Tieren anhand der reduzierten Schwellungsreaktion gefunden werden. Die in die Rezipienten transferierten Zellen haben eine weit gestreute Überlebenszeit, die von einigen Tagen bis Jahren reicht (234). In einer Untersuchung von Williams und Butcher (235) wurde die Migration von transferierten T-Zellen bei Mäusen beobachtet. Transferierte T-Zellen waren in der Lage, direkt aus dem Blut in die Milz zu wandern. Die Effizienz der Wanderung in die Milz unterschied sich nicht bei naiven T-Zellen und memory T-Zellen.

Zum gegenwärtigem Zeitpunkt ist noch nicht geklärt, welche Zellpopulation eine Suppression bewirken kann. So gibt es in der Literatur verschiedene Modellsysteme mit unterschiedlichen Erklärungsmöglichkeiten. Im UV-induzierten Toleranz-Modell kann die Schwellungsreaktion, die von Kontaktallergenen ausgelöst wird, mit Hilfe von UV-Licht supprimiert werden. Ullrich et al. (236) konnten mit Hilfe von Zelltransferversuchen an einem derartigen Modellsystem $CD4^+$ Suppressor-Zellen als die Zellen ausmachen, die die Suppression bedingen. Schwarz et al. (232) fanden im Modell der UV-induzierten Toleranz dagegen Hinweise darauf, daß die T-Zellen, die die Suppression transferieren können, $CD8^+$ -positiv sind. Steinbrink et al. (237) konnten im Modell der "low-zone-tolerance" die Suppression mit $CD8^+$ T-Zellen transferieren. Zusammengefaßt zeigen diese Studien, daß beide $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, abhängig vom Modellsystem, Suppression übertragen können. Gegenwärtig häufen sich die Hinweise, daß $CD8^+$ Zellen, ähnlich wie $CD4^+$ Zellen, in Typ1-Zellen (Tc1), die $IFN-\gamma$ sowie Lymphotoxin, und in Typ 2 Zellen (Tc2), die IL-4 sekretieren, unterteilt werden können (238,239). Im Modell der "low-zone-tolerance" konnten Steinbrink et al. (237) $CD8^+$ Tc2-Zellen als die verantwortlichen Suppressorzellen nachweisen, währenddessen Xu et al. (108) berichteten, daß eine Kontaktallergie durch $CD8^+$ -Tc1 Zellen verursacht wird und $CD4^+$ Th2-Zellen eine inhibitorische Funktion besitzen. Die Beobachtung von Gocinski et al. (107) unterstützt die Theorie, daß $CD8^+$ Zellen als Mediatorzellen bei einer Kontaktallergie fungieren können. In einer Untersuchung von Bour et al. (240) und Desvignes et al. (241) an MHC I-defizienten Mäusen, die keine $CD8^+$ -Zellen besitzen, konnte keine Schwellungsreaktion mit DNFB konstatiert werden. Dies spricht für $CD8^+$ -Zellen als die Effektorzellen bei der inflammatorischen Reaktion der Kontaktallergie. Im Gegensatz dazu war es möglich, eine kontaktallergische Reaktion bei MHC II-defizienten Mäusen, die eine

defekte CD4-Hilfe besitzen, auszulösen (241). Die Entwicklung einer Kontaktallergie scheint demnach unabhängig von CD4⁺ T-Zellen zu sein. In einer Untersuchung von Desvignes et al. (241) konnten bei einer Sensibilisierung über die Mundschleimhaut mit DNFB MHC Klasse I-restringierte CD8⁺-Effektor-Zellen und gegenregulatorisch wirksame MHC Klasse II-restringierte CD4⁺-T-Zellen identifiziert werden.

Die Interpretation dieser Beobachtungen stehen im Kontrast zu einer Reihe von Untersuchungen, die CD4⁺ T-Zellen als Effektorzellen bei einer CHS ansehen (242-244). In der vorliegenden Arbeit konnte trotz Depletion von CD4⁺ Zellen eine signifikante Reduktion der Schwellungsreaktion nach dem Transfer dieser Zellen in die Rezipienten beobachtet werden. Die Depletion von CD8⁺ Zellen bewirkte nach dem Transfer der Zellen eine leicht reduzierte Schwellungsreaktion in den Rezipienten im Vergleich zu den Kontrollen. Dies spricht für CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen der Suppression und steht damit im Einklang mit den Untersuchungen von Schwarz et al. (232).

Ein möglicher Einfluß von LF während der Behandlung der Mäuse auf Langerhans-Zellen wurde in der Arbeit anhand von weiteren Versuchen untersucht. Dazu wurde einerseits die morphologische Struktur LF-behandelter LC betrachtet und andererseits die Migrationsfähigkeit von LC bei LF-behandelten Mäusen analysiert. Schließlich wurde der Einfluß von LF auf die Expression von Oberflächenrezeptoren von D10.G4.1-Zellen als Modellsystem betrachtet.

Zur Untersuchung der Morphologie der LC von LF-behandelten Mäusen wurden Epidermal Sheets von LF-behandelten Mäusen, die mit DNFB konfrontiert worden waren, hergestellt. Da epidermale LC MHC II exprimieren (37), wurde eine MHC II-Färbung zur spezifischen Färbung der LC verwendet. Anhand der Präparate konnte die dendritische Morphologie der LC bei CMC-behandelten als auch bei LF-behandelten Mäusen festgestellt werden. Die Zellen lagen in einem gleichmäßigem Verteilungsmuster vor. Durch die kontaktallergische Reaktion lösen sich vereinzelt LC aus dem Verband und wandern in die Lymphknoten. Die in der Epidermis verbliebenen LC weisen einen vergrößerten Zellkörper und eine verstärkte Expression von MHC II-Molekülen auf (206,207). Dies war bei CMC- und auch LF-behandelten Tieren zu beobachten, so daß daraus geschlossen werden kann, daß LF auf die morphologische Struktur von LC keinen Einfluß hat.

Aus den vorherigen Experimenten konnte die Inhibition der Schwellungsreaktion im Zuge einer kontaktallergischen Reaktion durch LF beobachtet werden. Als ein möglicher Grund dafür könnte der Einfluß von LF auf die Expression von TNF- α sein. Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß LF auf die Expression von TNF wirkt (115). Da, wie im ersten Teil der Arbeit schon hinreichend erläutert, TNF als Migrationsstimulus für LC in die drainierenden Lymphknoten angesehen werden kann, kann so eine fehlende Wanderung von LC in die Lymphknoten als mögliche Ursache der Inhibition angenommen werden. Die Vermutung erfährt Bestätigung auch dadurch, daß bei der Präparation der cervikalen Lymphknoten von LF-behandelten Tieren, die mit DNFB sensibilisiert worden waren, keine vergrößerten Lymphknoten im Gegensatz zu den Kontrolltieren beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Um ausschließen zu können, daß die inhibitorische Schwellungsreaktion im Zuge einer kontaktallergischen Reaktion bei LF-behandelten Mäusen durch eine Migrationsstörung verursacht wird, wurde eine Migrationsanalyse mit LF-behandelten Mäusen durchgeführt.

Dazu wurde FITC auf die rechten Ohren LF-behandelter Mäuse appliziert; 24 h später wurden die cervikalen Lymphknoten entnommen und nach einer MHC II-Färbung im FACS untersucht.

Es konnten sowohl MHC II- als auch FITC-positive Zellen bei CMC-behandelten und LF-behandelten Mäusen festgestellt werden. Die nicht mit FITC in Kontakt gekommenen Milz-Zellen wiesen bei beiden Gruppen keine FITC-positiven Zellen auf. Es kann also als Grund für die inhibierte Schwellungsreaktion eine gestörte Migration der LC ausgeschlossen werden, da bei LF-behandelten Tieren deutlich FITC-positive und MHC II-positive Zellen gefunden wurden. Die Anteile beider Versuchsgruppen unterschieden sich auch nicht merklich, daß man von einem beeinträchtigtem Wanderungsverhalten der LC bei der LF-Behandlung nicht ausgehen kann.

Als weitere Ursache für die Inhibition der Schwellungsreaktion könnte ein inhibitorischer Einfluß von LF auf die T-Zellpopulation sein.

In der Literatur lassen sich ebenfalls Hinweise finden, daß LF auf die Expression von Mediatoren und Oberflächenmolekülen inhibitorisch wirkt. So wird von Barlett et al. (114) berichtet, daß LF die Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen und von Sauerstoff-basierenden Stoffen aus Granulozyten verhinderte. Weiterhin konnte beschrieben werden, daß LF die Expression des IL-2-Rezeptors sowie des Transferrin-Rezeptors inhibierte (116). Unter anderem könnte LF so die Proliferation von Kontaktallergen-spezifischen T-Zellen verhindern und somit die Schwellungsreaktion inhibieren. In dem in Abb. 50 beschriebenen Versuch wurden zwecks Klärung der Frage, ob LF die Expression von Oberflächenrezeptoren, die beim Aktivierungsprozeß in der Frühphase auftreten, inhibieren könnte, T-Zellen zusammen mit LF kultiviert und mittels FACS-Analyse auf die Expression von IL-2-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor und CD44 hin untersucht. Bei den verwendeten Konzentrationen von LF konnte bei allen drei Gruppen eine reduzierte Expression von IL-2-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor und CD44 festgestellt werden. Die Vitalität der untersuchten Zellen hatte sich auch bei den höchsten Konzentrationen, die verwendet wurden, nicht verringert, so daß ein toxischer Effekt als Ursache für die verringerte Expressionsstärke der untersuchten Rezeptoren ausgeschlossen werden kann.

Zuletzt wurde eine vereinfachte Applikationsform von LF getestet, weil aufgrund von Untersuchungen einer Arbeitsgruppe in der klinischen Studie LF bei Patienten Magenprobleme bereitet hatte (245). Da in Vorversuchen eine topische Applikation in Form von verschiedenen Salbengrundlagen keine inhibitorische Wirkung gezeigt hatte (Daten nicht gezeigt), wurde nun als weitere Möglichkeit der äußeren Anwendung LF direkt in Aceton/Olivenöl gelöst und zusammen mit dem Kontaktallergen aufgetragen. Es konnte auch in diesem Fall keine inhibitorische Wirkung von LF bei der kontaktallergischen Reaktion beobachtet werden.

Aus den gesammelten Daten kann man zu dem Schluß kommen, daß LF ein potenter Inhibitor einer kontaktallergischen Reaktion ist, wenn er in der Sensibilisierungsphase der CHS verabreicht wird. Die inhibitorische Wirkung von LF hält über ein längeren Zeitraum an und kann bei wiederholtem Kontakt mit dem Kontaktallergen noch wirksam sein. Die Suppression der Schwellungsreaktion konnte sowohl bei einer Irritation als auch bei Kontaktallergien, die von DNFB und Oxazolone ausgelöst wurden, beobachtet werden. Weiterhin konnte die Suppression auf naive Rezipienten übertragen werden, was für eine Aktivierung von Suppressor-Zellen spricht. Die Suppression der Schwellungsreaktion ist nicht auf eine

morphologische Veränderung der epidermalen LC oder eine gestörte Migrationsfähigkeit der LC zurückzuführen. Vielmehr scheint LF auf die Expression von Aktivierungssignalen bei T-Zellen zu wirken, wie auch durch Untersuchungen von Zielinski et al. (116,246) gezeigt werden konnte. Die orale Applikation ist in dieser Arbeit die einzig wirksame Applikationsform und bedarf weiterer Untersuchungen. Leflunomid ist als Medikationsmöglichkeit zur Inhibition einer Kontaktallergie geeignet.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Teil die Bedeutung des Tumor-Necrosis-Faktor auf eine Kontaktallergie anhand von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen untersucht. Mit Hilfe des Ohrschwellungsverlaufs einer von DNFB ausgelösten kontaktallergischen Reaktion konnte bei TNFR1-defizienten Mäusen eine leichte Überreaktivität und bei TNFR2-defizienten Mäusen eine statistisch abgesicherte Überreaktivität festgestellt werden. Eine ebenfalls überreaktive Schwellungsreaktion konnte bei TNFR2-defizienten Mäusen, die vorher mit Oxazolone behandelt worden waren, beobachtet werden. In den anschließend durchgeführten histologischen Untersuchungen der Langerhans-Zellen aus den TNFR-defizienten Mäusen zeigten sich keine sichtbaren Differenzen in bezug auf MHC II-Expression und Verteilung der Zellen. Eine unterschiedliche Stimulationskapazität konnte bei Langerhans-Zellen, die aus TNFR1- bzw. TNFR2-defizienten Mäusen isoliert worden waren, nicht beobachtet werden.

In Migrationsstudien, bei denen FITC als Kontaktallergen von Langerhans-Zellen aufgenommen, prozessiert und nach der Wanderung in die Lymphknoten präsentiert wurde, konnte keine verringerte Anzahl der migrierenden Zellen bei TNFR1-defizienten Mäusen festgestellt werden. Jedoch wurde eine reduzierte Anzahl FITC- und MHC II-doppelt-positiver Zellen aus TNFR2-defizienten Mäusen beobachtet.

Um Aufschlüsse über die Expression von TNF-Rezeptoren auf murinen Langerhans-Zellen gewinnen zu können, wurde mit Hilfe von Epidermal Sheets, zytofluorometrischen Analysen und RT-PCR-Analysen von Langerhans-Zellen die Expression der TNF-Rezeptoren untersucht. In Vorversuchen konnte die Expression von TNF-Rezeptoren auf Fibroblasten und T-Zellen gefunden werden. Weiterhin konnten beide TNF-Rezeptoren auf der Keratinozyten-Zelllinie PAM 212 nachgewiesen werden. Auf frisch isolierten Langerhans-Zellen, die mittels MicroBeads aus epidermalen Zellsuspensionen gewonnen wurden, konnten keine TNF-Rezeptoren beobachtet werden. Bei kultivierten Langerhans-Zellen konnte dagegen die Expression des TNFR2 festgestellt werden. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen konnte die mRNA des TNFR1 sowohl bei frisch isolierten als auch bei kultivierten Langerhans-Zellen nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung des Immunmodulators Leflunomid (LF) auf eine Kontaktallergie untersucht. Es konnte eine signifikant geringere Schwellungsreaktion im Zuge einer DNFB-induzierten Kontaktallergie bei LF-behandelten Mäusen festgestellt werden. Bei Experimenten zur Untersuchung des Wirkungszeitraums der inhibitorischen Wirkung von LF bei einer kontaktallergischen Reaktion konnte ein langanhaltender Effekt beobachtet werden.

Weiterhin konnte die inhibitorische Wirkung von LF auf eine von Oxazolone induzierte kontaktallergische Schwellungsreaktion und auf eine irritative Schwellungsreaktion beobachtet werden. Wie in einem weiteren Experiment festgestellt werden konnte, wirkte LF größtenteils antigenspezifisch.

Der Wirkungszeitpunkt von LF konnte in verschiedenen Experimenten, bei dem LF vor, während oder nach der Sensibilisierungsreaktion verabreicht worden war, festgestellt werden. Eine suppressive Wirkung von LF war nur dann zu beobachten, wenn LF während der Sensibilisierungsphase gegeben worden war.

Weiterhin konnte in Transfer-Experimenten festgestellt werden, daß die Inhibition der kontaktallergischen Schwellungsreaktion auf naive Tiere übertragbar ist. Außerdem wurden Hinweise gefunden, daß CD8⁺-T-Zellen als Effektorzellen bei der Suppression eine Rolle

spielen. Desweiteren konnte anhand von Untersuchungen von Epidermal Sheets von LF-behandelten Mäusen, die mit DNFB konfrontiert worden waren, keine morphologischen Unterschiede gefunden werden. Nach Erstellung von Migrationsanalysen für die zum Einsatz gekommenen Versuchsgruppen, d.h. sowohl für die LF-behandelten als auch für die Kontrollmäuse, konnte kein Einfluß von LF auf die Wanderungsfähigkeit von LC konstatiert werden. Anhand von FACS-Analysen konnte bei einer mit LF kultivierten T-Zelllinie eine reduzierte Expression des IL-2-, und Transferrin-Rezeptors sowie von CD44 beobachtet werden. Schließlich wurde bei Untersuchungen einer topischen Applikationsform von LF festgestellt, daß LF nur oral appliziert wirksam war.

VI. Bibliographie

1. **Streilein, J.W.** 1978. Lymphocyte traffic, T cell malignancies and the skin. *J.Invest.Dermatol.* 71:167.
2. **Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg.** 1986. The skin immune system: its cellular constituents and their interactions. *Immunol.Today* 7:235.
3. **Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg.** 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol.Today* 14:75.
4. **Romer, A. and T. Parsons.** 1983. *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere.* Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
5. **Kupper, T.S., A.O. Chua, P. Flood, J. McGuire, and U. Gubler.** 1987. Interleukin-1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J.Clin.Invest.* 80:430.
6. **Luger, T.A., B.M. Stadler, B.M. Luger, B.J. Mathieson, M. Mage, J.A. Schmidt, and J.J. Oppenheim.** 1982. Murine epidermal cell-derived thymocyte-activating factor resembles murine interleukin-1. *J.Immunol.* 128:2147.
7. **Luger, T.A., A. Kock, R. Kirnbauer, T. Schwarz, and J.C. Ansel.** 1998. Keratinocyte-derived interleukin-3. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 548:253.
8. **Gallo, R.L., R. Staszewski, D.N. Sauder, T.L. Knisely, and R.D. Granstein.** 1991. Regulation of GM-CSF and IL-3 production from the murine keratinocyte cell line PAM 212 following exposure to ultraviolet radiation. *J.Invest.Dermatol.* 97:203.
9. **Kupper, T.S., K. Min, P. Sehgal, H. Mizutani, N. Birchall, A. Ray, and L. May.** 1989. Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 557:454.
10. **Heufler, C., D. Young, C. Peschel, and G. Schuler.** 1990. Murine keratinocytes express interleukin-7 (abstr.). *J.Invest.Dermatol.* 94:534A.
11. **Haas, J., T. Lipkow, M. Mohamadzadeh, G. Kolde, and J. Knop.** 1992. Induction of inflammatory cytokines in murine keratinocytes upon in vivo stimulation with contact sensitizers and tolerizing analogues. *Exp.Dermatol.* 1:76.
12. **Enk, A.H. and S.I. Katz.** 1992. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J.Immunol.* 149:92.
13. **Enk, A.H. and S.I. Katz.** 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1398.
14. **Luger, T.A. and T. Schwarz.** 1990. Evidence for an epidermal cytokine network. *J.Invest.Dermatol.* 95:100.
15. **Tschachler, E., G. Schuler, J. Hutterer, H. Leibl, K. Wolff, and G. Stingl.** 1983. Expression of Thy-1 antigen by murine epidermal cells. *J.Invest.Dermatol.* 81:282.
16. **Berstresser, P.R., R.E. Tigelaar, J.H. Dees, and J.W. Streilein.** 1983. Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 81:286.
17. **Breathnach, S.M. and S.I. Katz.** 1984. Thy-1⁺ dendritic cells in murine epidermis are bone marrow-derived. *J.Invest.Dermatol.* 83:74.
18. **Steiner, G., F. Koning, A. Elbe, E. Tschachler, W.M. Yokohama, E.M. Shevach, G. Stingl, and J.E. Coligan.** 1988. Characterization of T cell receptors on resident murine dendritic T cells. *Eur.J.Immunol.* 18:1323.

19. **Sullivan, S., P.R. Berstreser, R.E. Tigelaar, and J.W. Streilein.** 1986. Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident bone marrow-derived dendritic epidermal cells: Langerhans cells and Thy-1⁺ epidermal cells. *J.Immunol.* 137:2460.
20. **Bigby, M., T. Kwan, and M.S. Sy.** 1987. Ratio of Langerhans cells to Thy-1⁺ dendritic epidermal cells in murine epidermis influences the intensity of contact hypersensitivity. *J.Invest.Dermatol.* 89:495.
21. **Welsh, E.A. and M.L. Kripke.** 1990. Murine Thy-1⁺ dendritic epidermal cells induce immunologic tolerance in vivo. *J.Immunol.* 144:883.
22. **Stingl, G., E. Tschachler, V. Groth, and K. Wolff.** 1989. *Norris, D.A. (ed). Immune mechanisms in cutaneous disease Immunology Series.* Marcel Dekker Inc., New York, S. 3.
23. **Breathnach, S.M.** 1988. The Langerhans cell. *Brit.J.Dermatol.* 199:463.
24. **Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg.** 1986. The skin immune system. *Immunol.Today* 7:235.
25. **Meunier, I., A. Gonzalez-Ramos, and K. Cooper.** 1993. Heterogeneous population of class II MHC⁺ cells in human dermal cell suspensions. *J.Immunol.* 151(8):4067.
26. **Lenz, A., M. Heine, G. Schuler, and N. Romani.** 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. *J.Clin.Invest.* 92:2587.
27. **Wolff, K. and R.K. Winkelman.** 1967. Quantitative studies on the Langerhans cell population of guinea pig epidermis. *J.Invest.Dermatol.* 48:504.
28. **Birbeck, M.S., A.S. Breathnach, and J.D. Everall.** 1961. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J.Invest.Dermatol.* 37:51.
29. **Bucana, C.D., C.G. Munn, M.J. Song, K. Dunner, and M.L. Kripke.** 1992. Internalization of Ia molecules into birbeck granule-like structures in murine dendritic cells. *J.Invest.Dermatol.* 99:365.
30. **Katz, S.I., K. Tamaki, and D.H. Sachs.** 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324.
31. **Fraissienette, A., M.J. Staquet, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Thivolet.** 1988. Langerhans cells in S-Phase in normal skin detected by simultaneous analysis of surface antigen and BrdU incorporation. *J.Invest.Dermatol.* 91:603.
32. **Langerhans, P.** 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.(Pathol.Anat.)* 44:325.
33. **Silberberg, I.** 1973. Apposition of mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reaction. *The Immunologist* 53:1.
34. **Stingl, G., E. Wolff-Schreiner, W.J. Pichler, F. Gschnait, and W. Knapp.** 1977. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268:245.
35. **Rowden, G., M.G. Lewis, and A.K. Sullivan.** 1977. Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268:247.
36. **Stingl, G., S.I. Katz, E.M. Shevach, E. Wolff-Schreiner, and I. Green.** 1978. Detection of Ia antigens on Langerhans cells in guinea pig skin. *J.Immunol.* 120:570.
37. **Tamaki, K., G. Stingl, M. Gullino, D.H. Sachs, and S.I. Katz.** 1978. Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J.Immunol.* 123:784.

38. **Klareskop, L., U.M. Tjernlund, U. Forsum, and P.A. Peterson.** 1977. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268:248.
39. **Lenz, A., C. Heufler, H.G. Rammensee, H. Glassel, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1989. Murine epidermal Langerhans cells express significant amounts of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 8:7527.
40. **Haines, K.A., T.J. Flotte, T.A. Springer, I. Gigli, and G.J. Thorbecke.** 1983. Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 80:3448.
41. **Wood, G.S., N.L. Warner, and R.A. Warnke.** 1983. Leu/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans cells lineage. *J.Immunol.* 131:212.
42. **Fithian, E., P. Kung, G. Goldstein, M. Rubinfeld, C. Fenoglio, and R. Edelson.** 1981. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2541.
43. **Knowles, R.W. and W.F. Bodmer.** 1982. A monoclonal antibody recognizing a human thymus leukemia-like antigen associated with beta 2-microglobulin. *Eur.J.Immunol.* 12:676.
44. **van de Rijn, M., P.G. Lerch, B.R. Bronstein, R.W. Knowles, A.K. Bhan, and C. Terhost.** 1984. Human cutaneous dendritic cells express two glycoproteins T6 and M241 which are biochemically identical to those found on cortical thymocytes. *Hum.Immunol.* 9:201.
45. **Taylor, R.S., O. Baadsgaard, C. Hammerberg, and K.D. Cooper.** 1991. Hyperstimulatory CD1a⁺ CD1b⁺ CD36⁺ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis. *J.Immunol.* 147:3794.
46. **Romani, N., A. Lenz, H. Glassel, H. Stössel, U. Stanzl, O. Majdic, P. Fritsch, and G. Schuler.** 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J.Invest.Dermatol.* 93:600.
47. **Teunissen, M.B.M., J. Wormmeester, S.R. Krieg, P.J. Peters, I.M.C. Vogels, M.L. Kapsenberg, and J.D. Bos.** 1990. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. *J.Invest.Dermatol.* 94:166.
48. **De Panfilis, G., G.C. Manara, C. Ferrari, and C. Torresani.** 1990. Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. II. The intracellular adhesion molecule-1 is constitutively present on the surface of human resting Langerhans cells. *J.Invest.Dermatol.* 94:317.
49. **Enk, A.H. and S.I. Katz.** 1994. Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells. *J.Immunol.* 152:3264.
50. **Schmitt, D., T. Bieber, J.P. Cazanave, and D. Hanau.** 1990. Fc receptors of human Langerhans cells. *J.Invest.Dermatol.* 94:15S.
51. **Bieber, T., H. de la Salle, C. de la Salle, D. Hanau, and A. Wollenberg.** 1992. Expression of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) on human Langerhans cells: the end of a dogma. *J.Invest.Dermatol.* 99:10S.
52. **Heufler, C., G. Topar, F. Koch, B. Trockenbacher, E. Kämpgen, N. Romani, and G. Schuler.** 1992. Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: interleukin 1 beta and macrophage inflammatory protein 1 alpha are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J.Exp.Med.* 176:1221.

53. **Schreiber, S., O. Kilgus, E. Payer, R. Kutil, A. Elbe, C. Mueller, and G. Stingl.** 1992. Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J.Immunol.* 149:3524.
54. **Becker, D., M. Mohamadzadeh, K. Reske, and J. Knop.** 1992. Increased level of intracellular MHC II molecules in murine Langerhans cells following in vivo and in vitro administration of contact allergens. *J.Invest.Dermatol.* 99:545.
55. **Neiss, U. and K. Reske.** 1994. Non-coordinate synthesis of MHC class II proteins and invariant chains by epidermal Langerhans cells derived from short-term in vitro culture. *Int.Immunol.* 6:61.
56. **Becker, D., U. Neiss, S. Neis, K. Reske, and J. Knop.** 1992. Contact allergens modulate the expression of MHC class II on murine epidermal Langerhans cells by endocytotic mechanisms. *J.Invest.Dermatol.* 98:700.
57. **Schuler, G. and R.M. Steinman.** 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J.Exp.Med.* 161:526.
58. **Witner-Pack, M.D., J. Valinsky, W. Olivier, and R.M. Steinman.** 1988. Quantitation of surface antigens on cultured murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J.Invest.Dermatol.* 90:387.
59. **Steiner, G., E. Tschachler, M. Tani, T.R. Malek, E.M. Shevach, W. Holter, W. Knapp, K. Wolff, and G. Stingl.** 1986. Interleukin-2 receptors on cultured murine epidermal Langerhans cells. *J.Immunol.* 137:155.
60. **Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Röllinghoff.** 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen- specific T cells. *Eur.J.Immunol.* 23:1595.
61. **Blank, C., H. Fuchs, K. Rappersberger, M. Röllinghoff, and H. Moll.** 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous *Leishmaniasis* with *Leishmania major*. *J.I.D.* 167:418.
62. **Frelinger, J.G., L. Hood, S. Hill, and J.A. Frelinger.** 1979. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282:321.
63. **Kämpgen, E., F. Koch, C. Heufler, A. Eggert, L. Gill, S. Gillis, S. Dower, N. Romani, and G. Schuler.** 1994. Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J.Exp.Med.* 179:1767.
64. **Wolff, K. and E. Schreiner.** 1970. Uptake, intracellular transport and degradation of exogenous protein by Langerhans cells. *J.Invest.Dermatol.* 54 :37.
65. **Stingl, G., S.I. Katz, L. Clement, I. Green, and E.M. Shevach.** 1978. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J.Immunol.* 121:2005.
66. **Braathen, L.R. and E. Thorsby.** 1980. Studies on human epidermal Langerhans cells. *Scand.J.Immunol.* 11:401.
67. **Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, S.M. Livingstone, C.G. Fathman, K. Inaba, and R.M. Steinman.** 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. *J.Exp.Med.* 169:1169.
68. **Streilein, J.W. and S.F. Grammer.** 1989. In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J.Immunol.* 143:3925.
69. **Inaba, K., G. Schuler, M.D. Witner, J. Valinsky, B. Atassi, and R.M. Steinman.** 1986. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 164:605.

70. **Picut, C.A., C.S. Lee, E.P. Dougherty, R.M. Anderson, and R.M. Lewis.** 1988. Immunostimulatory capabilities of highly enriched Langerhans cells in vitro. *J.Invest.Dermatol.* 90:201.
71. **Inaba, K., M. Witmer-Pack, K.S. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.J. Hodes, and R.M. Steinman.** 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J.Ex.Med.* 180:1849.
72. **Lee, M.G., T.A. Borkowski, and M.C. Udey.** 1993. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J.Invest.Dermatol.* 101:883.
73. **Witmer-Pack, M.D., W. Olivier, J. Valinsky, G. Schuler, and R.M. Steinman.** 1989. Granulocytes/macrophage colony stimulating-factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 169:1169.
74. **Heufler, C., F. Koch, and G. Schuler.** 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* 167:700.
75. **Koch, F., C. Heufler, E. Kämpgen, D. Schneeweiss, G. Böck, and G. Schuler.** 1990. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation. *J.Exp.Med.* 171:159.
76. **Kupper, T.S., D. Coleman, J. McGurie, and D. Goldminz.** 1986. Keratinocyte-driven T-cell growth factor: A T-cell growth factor functionally distinct from interleukin-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83:4451.
77. **Kupper, T.S., F. Lee, D. Coleman, J. Chodakewitz, P. Flood, and M. Horowitz.** 1988. Keratinocyte derived T-cell growth factor (KTGF) is identical to granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J.Invest.Dermatol.* 91:185.
78. **Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber.** 1997. Stimulation of Langerhans cell migration in mice by tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Dendritic cells in Fundamental and Clinical Immunology.* Vol.3 P. Ricciardi-Castagnoli, Plenum Press, New York, S. 121.
79. **Rambukkana, A., F. Pistor, J.D. Bos, M.L. Kapsenberg, and P.K. Das.** 1996. Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture: migration, modulation of cell surface molecules, and early expression of interleukin-1 beta protein. *Lab.Invest.* 74:422.
80. **Cumberbatch, M. and I. Kimber.** 1992. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology* 75:257.
81. **Cumberbatch, M., I. Fielding, and I. Kimber.** 1994. Modulation of epidermal Langerhans cell frequency by tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 81:395.
82. **Cumberbatch, M. and I. Kimber.** 1995. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 84:31.

83. **Matsue, H., P.D. Cruz, P.R. Berstreser, and A. Takashima.** 1992. Langerhans cells are the major source of mRNA for IL-1 beta and MIP-1 alpha among unstimulated mouse epidermal cells. *J.Invest.Dermatol.* 99:537.
84. **Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male.** 1991. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 295ff.
85. **Knop, J.** 1990. Das allergische Kontaktekzem - Krankheit und Modell. *Forschungsmagazin der Universität Mainz* 1:71.
86. **Saloga, J., J. Knop, and K. Kolde.** 1988. Ultrastructural cytochemical visualization of chromium in the skin of sensitized guinea pigs. *Arch.Dermatol.Res.* 280:214.
87. **Kolde, G. and J. Knop.** 1988. Ultrastructural localization of 2,4,-dinitrophenyl groups in mouse epidermis following skin painting with 2,4- dinitroflourbenzene and 2,4-dinitrothiocyanatebenzene: An immunoelectron microscopical study. *J.Invest.Dermatol.* 90:320.
88. **Aiba,S., A. Terunuma, H. Manoma, H. Tagami.** 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur.J.Immunol.* 27(11):3031.
89. **Landsteiner, K. and M. Chase.** 1942. Experiments on the transfer of cutaneous sensitivity to simple chemical compounds. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 49:688.
90. **Frey, J. and P. Wenk.** 1957. Experimental studies on the pathogenesis of contact eczema in guinea pigs. *Arch.Allergy.Appl.Immunol.* 11:81.
91. **Macher, E. and M.W. Chase.** 1969. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. XII. The influence of excision of allergenic depots on onset of delayed hypersensitivity and tolerance. *J.Exp.Med.* 129:103.
92. **Silberberg-Sinakin, I., G.J. Thorbecke, G. Baer, S.A. Rosenthal, and V. Berezowsky.** 1976. Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell.Immunol.* 25:445.
93. **Toews, G.B., P.R. Berstreser, and J.W. Streilein.** 1980. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J.Immunol.* 124:445.
94. **Silberberg, I., R.L. Baer, S.A. Rosenthal, G.J. Thorbecke, and V. Berezowsky.** 1975. Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. *Cell.Immunol.* 18:435.
95. **Shelly, W.B. and L. Juhlin.** 1976. Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens. *Nature* 261:46.
96. **Streilein, J.W. and P.R. Berstreser.** 1981. Langerhans cell function dictates induction of contact hypersensitivity or unresponsiveness to DNFB in syrian hamsters. *J.Invest.Dermatol.* 77:272.
97. **Knight, S.C., J. Krejci, M. Malkovsky, V. Colizzi, A. Gautam, and G.L. Ashershon.** 1985. The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. In vivo exposure to antigen. *Cell.Immunol.* 94:427.
98. **Macatonia, S.E., A.J. Edwards, and S.C. Knight.** 1986. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 59:509.
99. **Kripke, M.D., C. Gweyneth Mann, A. Jeeran, J. Tang, and C. Bucana.** 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J.Immunol.* 145:2833.
100. **Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober.** 1994. *Cellular and molecular immunology.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA. S. 263ff.

101. **Larsen, C.P., R.M. Steinman, M. Witmer-Pack, D.F. Hankins, P.J. Morris, and J.M. Austyn.** 1990. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J.Exp.Med.* 172:1483.
102. **Romagnoli, P., A.M. Labhardt, and F. Sinigaglia.** 1991. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO* 10(6):1303.
103. **Macatonia, S.E., S.C. Knight, A.J. Edwards, S. Griffiths, and P. Fryer.** 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J.Exp.Med.* 166:1654.
104. **Jakob, T., A. Saitoh, and M.C. Udey.** 1997. E-Cadherin-mediated adhesion involving Langerhans cell-like dendritic cells expanded from murine fetal skin. *J.Immunol.* 159:2693.
105. **Jakob, T. and M.C. Udey.** 1998. Regulation of E-Cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J.Immunol.* 160:4067.
106. **Tang, A., M. Amagai, L.G. Granger, J.R. Stanley, and M.C. Udey.** 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocyte mediated by E-Cadherin. *Nature* 361:82.
107. **Gocinzki, B.L. and R.E. Tigelaar.** 1990. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J.Immunol.* 144:4121.
108. **Xu, H., N.A. Diluolio, and R.L. Fairchild.** 1996. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: Interferon-producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and Interleukin-4/Interleukin-10 producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells. *J.Exp.Med.* 183:1004.
109. **Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman.** 1986. Two Types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136:2348.
110. **Cher, D.J. and T.R. Mosmann.** 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J.Immunol.* 138:3688.
111. **Alderson, M.R., R.J. Armitage, T.W. Tough, L. Strockbine, W.C. Fanslow, and M.K. Spriggs.** 1993. CD40 expression by human monocytes regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J.Exp.Med.* 178:669.
112. **Bartlett, R.R., T. Zielinski, G. Campion, P. Musikic, R. Schleyerbach, and H.U. Schorlemmer.** 1994. Chapter 20: Leflunomide: A novel immunomodulating drug. *Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs II.* A.J. Lewis and D. Furst, (eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., S. 349ff.
113. **Bartlett, R.R. and R. Schleyerbach.** 1985. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol derivative, HWA 486, with potential antirheumatic activity: I. Disease modifying action on adjuvant arthritis of the rat. *Int.J.Immunopharmac.* 7:7.
114. **Bartlett, R.R., H. Anagnosotpulos, T. Zielinski, T. Mattar, and R. Schleyerbach.** 1993. Effects of leflunomide on immune responses and models of inflammation. *Springer Sem.Immunopath.* 14:381.
115. **Bartlett, R. R.** Proceedings of the Vienna Symposium, 12 October 1993. 1995. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag. S.10.
116. **Zielinski, T., H. Müller, and R.R. Bartlett.** 1993. Effects of Leflunomide (HWA 486) on expression of lymphocyte activation markers. *Agents Actions* 38:C80.

117. **Cherwinski, H.M., R. Cohn, P. Cheung, D. Webster, Y. Xu, J. Caulfield, J. Young, G. Nakano, and J.T. Ransom.** 1995. The immunosuppressant Leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis. *J.Pharm.Exp.Therapeutics* 275:1043.
118. **Xu, X., J. Williams, H. Gong, A. Finnegan, and A. Chong.** 1996. Two activities of the immunosuppressive metabolite of Leflunomide, A77 1726: Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochemical Pharmacology* 52:527.
119. **Elder, R., X. Xu, J. Williams, H. Gong, A. Finnegan, and A. Chong.** 1997. The immunosuppressive metabolite of Leflunomide, A77 1726, affects murine T cells through two biochemical mechanisms. *J.Immunol.* 159:22.
120. **Glant, T., K. Mikecz, R.R. Bartlett, F. Deak, E. Thonar, J. Williams, T. Mattar, K. Küttner, and R. Schleyerbach.** 1992. Immunomodulation of preoglyan-induced progressive polyarthritis by leflunomide. *Int.J.Immunopharmacol.* 23:105.
121. **Bartlett, R.R., S. Brendel, T. Zielinski, and H.U. Schorlemmer.** 1996. Leflunomide, an immunorestoring drug for the therapy of autoimmune disorders, especially rheumatoid arthritis. *Transplantation Proceedings* 28:3074.
122. **Xu, X., L. Blinder, J. Shen, H. Gong, A. Finnegan, J. Williams, and A. Chong.** 1997. In vivo mechanism by which Leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr Mice. *J.Immunol.* 159:167.
123. **Bartlett, R.R., M. Dimitrijevic, T. Mattar, T. Zielinski, T. Germann, E. Rude, G. Thoenes, C. Kuchle, H.U. Schorlemmer, E. Bremmer, A. Finnegan, and R. Schleyerbach.** 1991. Leflunomide (HWA 486), a novel immunomodulating compound for the treatment of autoimmune disorders and reactions leading to transplantation rejections. *Agents Actions* 32:10.
124. **Thoenes, G., T. Sitter, H. Langer, R.R. Bartlett, and R. Schleyerbach.** 1989. Leflunomide (HWA 486) inhibits experimental autoimmune tubuointerstitial nephritis in rats. *Int.J.Immunopharmac.* 11:921.
125. **Ogawa, T., M. Inazu, K. Gotoh, and S. Hayashi.** 1990. Effects of Leflunomide on glomerulonephritis induced by antibasement membrane antibody in rats. *Agents Actions* 31:321.
126. **Smith-Lang, L., L. Glaser, K. Wiemer, and S. Robertson.** 1993. Efficacy of topically applied Leflunomide and Cyclosporin A in a model of autoimmune uveitis. *Proceedings of the 3rd international symposium on uveitis.* Kugler Publications, Amsterdam
127. **Smith-Lang, L., B. Glaser, L. Weimer, S. Miller, S. Robertson, K. Aoki, and J. Yanni.** 1992. Efficacy of novel immunomodulators leflunomide and rapamycin in autoimmune Uveitis. *FASEB.J.* 6:A1048.
128. **Popoviv, S. and R.R. Bartlett.** 1987. The use of the murine chronic graft versus host (CGVH) disease, a model for systemic lupus erythematosus (SLE), for drug discovery. *Agents Actions* 21:284.
129. **Mrowka, C., G. Thönes, K. Langer, and R.R. Bartlett.** 1994. Prevention of acute graft versus host disease (GVHD) in rats by the immunomodulating drug leflunomide. *Annals Hematology* 68:195.
130. **Kuchle, C., G. Thönes, K. Langer, H.U. Schorlemmer, R.R. Bartlett, and R. Schleyerbach.** 1991. Prevention of kidney and skin graft rejection in rats by leflunomide, a new immunomodulating agent. *Transplantation Proceedings* 23:1083.

131. **Schorlemmer, H.U., F. Seiler, and R.R. Bartlett.** 1993. Prolongation of allogeneic transplanted skin grafts and induction of tolerance by leflunomide (HWA 486), a new immunosuppressive isoxazol derivate. *Transplantation Proceedings* 25:763.
132. **Eber, E., T. Uhlig, C. McMenemy, and P.D. Sly.** 1998. Leflunomide, a novel immunomodulating agent, prevents the development of allergic sensitization in an animal model of allergic asthma. *Clin.Exp.Allergy* 28:376.
133. **Uhlig, T., D. Cooper, E. Eber, C. McMenemy, J.H. Wildhaber, and P.D. Sly.** 1998. Effects of long term oral treatment with Leflunomide on allergic sensitization, lymphocyte activation, and airway inflammation in a rat model of asthma. *Clin.Exp.Allergy* 28:758.
134. **Jarman, E.R., A. Kuba, E. Montermann, R.R. Bartlett, and A.B. Reske-Kunz.** 1999. Inhibition of murine IgE and immediate cutaneous hypersensitivity response to ovalbumin by the immunomodulatory agent leflunomide. *Clin.Exp.Immunol.* 115:221.
135. **Pharmaceutical and Biotechnology Press Releases.** 1999. Arava (Leflunomide) recommended for approval by FDA advisory committee for treatment of adult rheumatoid arthritis (RA). PharmInfoNet Homepage, http://pharminfo.com/drugpr/arava_pr.html
136. **Coley, W.** 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *AmJ.Med.Sci.* 105:487.
137. **Old, L.J.** 1985. Tumor necrosis factor. *Science* 230:630.
138. **Beutler, B., D. Greenwald, J.D. Hulmes, M. Chang, Y.-C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami.** 1985. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. *Nature* 316:552.
139. **Paul, N. and N. Ruddle.** 1988. Lymphotoxin. *Annu.Rev.Immunol.* 6:407.
140. **Loetscher, H., M. Brockhaus, Z. Dembic, R. Gentz, U. Gubler, H.P. Hohmann, H.W. Lahm, A.P. Van Loon, Y.C. Pan, E.J. Schlaeger, M. Steinmetz, H. Tabuchi, and W. Lesslauer.** 1991. Two distinct tumor necrosis factor receptors: members of a new cytokine receptor gene family. *Oxford Surv.Euk.Genes* 7:119.
141. **Eck, M.J., M. Ultsch, E. Rinderknecht, A.M. de Vos, and S.R. Sprang.** 1992. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J.Biol.Chem.* 267:2119.
142. **Eck, M.J. and S.R. Sprang.** 1989. The structure of tumor necrosis factor alpha at 2.6 A resolution: implications for receptor binding. *J.Biol.Chem.* 264:17595.
143. **Gearing, A.J.H., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A.H. Davidson, A.H. Drummond, W.A. Galloway, R. Gilbert, and J.L. Gordon.** 1994. Processing of tumor necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370:555.
144. **Manogue, K.R.** 1991. *The Cytokine Handbook.* Academic Press, London, S. 241.
145. **Streilein, J.W., S.F. Grammer, T. Yoshikawa, A. Demidem, and M. Vermeer.** 1990. Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol.Rev.* 117:158.
146. **Vermeer, M. and J.W. Streilein.** 1990. Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells mediated in part by tumour necrosis factor-alpha. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 7:258.
147. **Yoshikawa, T. and J.W. Streilein.** 1990. TNF-alpha released by UVB-treated keratinocytes impairs induction of contact hypersensitivity. *J.Invest.Dermatol.* 94:593.

148. **Yoshikawa, T., I. Kurimoto, and J.W. Streilein.** 1992. Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunology* 76:264.
149. **Simon, J.C., D. Edelbaum, P.R. Berstreser, and P.D. Cruz.** 1991. Distorted antigen-presenting function of Langerhans cells induced by tumour necrosis factor alpha via a mechanism that appears different from that induced by ultraviolet B radiation. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* 8:190.
150. **Sallusto, F. and A. Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179:1109.
151. **Grabrilovitch, D.I., G.M. Woods, S. Patterson, J.J. Harvey, and S.C. Knight.** 1994. Retrovirus-induced immunosuppression via blocking of dendritic cell migration and down-regulation of adhesion molecules. *Immunology* 82:82.
152. **Bromberg, J.S., K.D. Chavin, and S.L. Kunkel.** 1992. Anti-tumor necrosis factor antibodies suppress cell-mediated immunity in vivo. *J.Immunol.* 148:3412.
153. **Oxholm, A., P. Oxholm, C. Avnstorp, and K. Bendtzen.** 1991. Keratinocyte-expression of interleukin-6 but not of tumour necrosis factor-alpha is increased in the allergic and the irritant patch test reaction. *Acta.Derm.Venereol.* 71:93.
154. **Piguet, P.F., G.E. Grau, C. Hauser, and P. Vassalli.** 1991. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J.Exp.Med.* 173:673.
155. **Smith, C.A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M.P. Beckmann, R. Jerzy, S.K. Dower, D. Cosman, and R.G. Goodwin.** 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248 :1019.
156. **Schall, T.J., M. Lewis, K.J. Koller, A. Lee, G.C. Rice, G.H. Wong, T. Gatanaga, G.A. Granger, R. Lentz, and H. Raab.** 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61:631.
157. **Loetscher, H., Y.C. Pan, H.W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi, and W. Lesslauer.** 1990. Molecular cloning and expression of the human 55kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351.
158. **Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, and K. Pfizenmaier.** 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793.
159. **Vandenabeele, P., W. Declerq, R. Beyaert, W. Fiers.** 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5:392.
160. **Engelmann, H., H. Holtmann, C. Brakebush, Y.S. Avni, I. Sarov, Y. Nophar, E. Hadas, O. Leitner, and D. Wallach.** 1990. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis (TNF) receptor have TNF-like activity. *J.Biol.Chem.* 265:14497.
161. **Espevik, T., M. Brockhaus, H. Loetscher, U. Nonstad, and R. Shalaby.** 1990. Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor. *J.Exp.Med.* 171:415.
162. **Shalaby, M.R., A. Sundan, H. Loetscher, M. Brockhaus, W. Lesslauer, and T. Espevik.** 1990. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factors. *J.Exp.Med.* 172:1517.

163. **Naume, B., M.R. Shalaby, W. Lesslauer, and T. Espevik.** 1991. Involvement of the 55- and 75-kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells. *J.Immunol.* 146:3045.
164. **Hohmann, H.P., M. Brockhaus, P.A. Baeuerle, R. Remy, R. Kolbeck, and A.P. Van Loon.** 1990. Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF-kappa B. TNF-alpha is not needed for induction of a biological effect via TNF receptors. *J.Biol.Chem.* 265:22409.
165. **Tartaglia, L.A., R.F. Weber, I.S. Figari, C. Reynolds, M.A. Palladino, and D.V. Goeddel.** 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9292.
166. **Schlessinger, J.** 1988. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem.Sci.* 13:443.
167. **Ullrich, A. and J. Schlessinger.** 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203.
168. **Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann.** 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364:798.
169. **Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. Kuendig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P. Ohashi, M. Kroenke, and T.W. Mak.** 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457.
170. **Neumann, B., T. Machleidt, A. Lifka, K. Pfeffer, D. Vestweber, T.W. Mak, B. Holzmann, and M. Kroenke.** 1996. Crucial role of 55 kd TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J.Immunol.* 156:1587.
171. **Vieira, L., M. Goldschmidt, M. Nashleas, K. Pfeffer, T. Mak, and P. Scott.** 1996. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J.Immunol.* 157:827.
172. **Matsumoto, M., Y. Fu, H. Molina, G. Huang, J. Kim, D. Thomas, M. Nahm, and D. Chaplin.** 1997. Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J.Exp.Med.* 12:1997.
173. **Erickson, S., F. De Sauvage, K. Kikly, K. Carver-Moore, S. Pitts-Meek, N. Gilett, K. Sheehan, R.D. Schreiber, D. Goeddel, and M. Moore.** 1994. Decreased sensitivity to tumor-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372:560.
174. **Bruce, A., W. Boling, M. Kindy, J. Peschon, P. Kraemer, M. Carpenter, F. Holtsberg, and M. Mattson.** 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Medicine* 2:788.
175. **Lucas, R., P. Juillard, E. Decoster, M. Redard, D. Burger, Y. Donati, C. Giroud, C. Monso-Hinard, T. De Kesel, W. Buurman, M. Moore, J.M. Dayer, W. Fiers, H. Bluethmann, and G. Grau.** 1997. Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membran-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur.J.Immunol.* 27:1719.

176. **Karasuyama, J. and F. Melchers.** 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of IL-2, 3, 4 and 5 using modified cDNA expression vectors. *Eur.J.Immunol.* 18:97.
177. **Cobbold, S.P., A. Jayasuriya, A. Nash, T.D. Prospero, and H. Waldmann.** 1984. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 5994:548.
178. **Kaye, J., S. Gillis, S. Mizel, E.M. Shevach, T. Malek, C. Dinarello, L. Lachman, and C. Janeway.** 1984. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptors: interleukin-1 is required for the expression of the receptors for interleukin-2. *J.Immunol.* 133:1339.
179. **Reske-Kunz, A.B. and T. Diamantstein.** 1987. Evaluation of antigen presentation by a murine Ia⁺ T-cell clone, BK-BI-2.6.C6. *Immunology* 64:489.
180. **Reske-Kunz, A.B., G. Rück, P. Steinlein, and K. Reske.** 1988. Identification of transcripts of the T cell antigen receptor beta chain gene and MHC class II genes in antigen-presenting cloned BK-BI-2.6.C6 cells. *Scand.J.Immunol.* 27:107.
181. **Sanford, K.K., W.R. Earle, and Likely.** 1948. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 9:229.
182. **Espevik, T. and J. Nissen-Meyer.** 1986. A highly sensitive cell line, WEHI-164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J.Immu.Methods* 95:99.
183. **Röllinghoff, M. and N.L. Warner.** 1973. Specificity of in vivo tumour rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumour cells. *Proc.Soc.Exp.Med.Biol.* 144:813.
184. **Yuspa, S.H., P. Hawley-Johnson, B. Koehler, and J.R. Stanley.** 1980. A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture. *Cancer research* 40:4694.
185. **Gillis, S. and K.A. Smith.** 1977. Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268:154.
186. **Knippers, R., P. Philippsen, K. Schäfers, and E. Fanning.** 1990. *Molekulare Genetik.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 305.
187. **Hanau, D., D. Schmitt, M. Fabre, and J.P. Cazenave.** 1988. A Method for the rapid Isolation of human epidermal Langerhans cells using immunomagnetic microspheres. *J.Invest.Dermatol.* 91:274.
188. **Juhlin, L. and W.B. Shelley.** 1977. New staining techniques for the Langerhans cell. *Acta Dermatovener (Stockholm)* 57:289.
189. **Asherson, G.L. and W. Ptak.** 1968. Contact and delayed type hypersensitivity in the mouse active sensitization and passive transfer. *Immunology* 15:405.
190. **Goodwin, R.G., D. Anderson, R. Jerzy, T. Davis, C.I. Brannan, N. Copeland, N. Jenkins, and C.A. Smith.** 1991. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol.Cell.Biol.* 11:3020.
191. **Rothe, J., M. Brockhaus, R. Gentz, and W. Lesslauer.** 1991. Molecular cloning and expression of the mouse TNF receptor type b. *Immunogenetics* 34:338.
192. **Sachs, L.** 1992. *Angewandte Statistik.* Springer-Verlag, Berlin
193. **Lehner, P.** 1987. *Handbook of ethological methods.* Garland STPM Press, New York.
194. **Traidl, C., F. Jugert, T. Krieg, H. Merk, and N. Hunzelmann.** 1999. Inhibition of allergic contact dermatitis to DNCB but not to Oxazolone in interleukin-4 deficient mice. *J.Invest.Dermatol.* 112:476.

195. **Tartaglia, L., D. Pennica, and D. Goeddel.** 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J.Biol.Chem.* 268:18542.
196. **Ryffel, B., M. Brockhaus, B. Greiner, M. Mihatsch, and F. Gudat.** 1991. Tumour necrosis factor receptor distribution in human lymphoid tissue. *Immunology* 74:446.
197. **Larregina, A., A. Morelli, E. Kolkowski, and L. Fainboim.** 1996. Flow cytometric analysis of cytokine receptors on human Langerhans' cells. Changes observed after short-term culture. *Immunology* 87:317.
198. **Wang, B., S. Kondo, G. Shivji, H. Fujisawa, T. Mak, and D.N. Sauder.** 1996. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans cells. *Immunology* 88:284.
199. **Wang, B., H. Fujisawa, L. Zhuang, S. Kondo, G. Shivji, C. Kim, T.W. Mak, and D.N. Sauder.** 1997. Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity in mice lacking TNF receptor p75. *J.Immunol.* 159:6148.
200. **Kimber, I., R.J. Dearman, M. Cumberbatch, and R.J.D. Huby.** 1998. Langerhans cells and chemical allergy. *Current opinion in Immunology* 10:614.
201. **Weigmann, B., J. Schwing, H. Huber, R. Ross, H. Mossmann, J. Knop, and A.B. Reske-Kunz.** 1997. Diminished contact hypersensitivity response in IL-4 deficient mice at a late phase of the elicitation reaction. *Scand.J.Immunol.* 45:308.
202. **Kondo, S., B. Wang, H. Fujisawa, G. Shivji, B. Echterbacher, T. Mak, and D.N. Sauder.** 1995. Effect of gene-targeted mutation in TNF receptor (p55) on contact hypersensitivity and ultraviolet B-induced immunosuppression. *J.Immunol.* 155:3801.
203. **Bacci, S., P. Alard, R. Dai, T. Nakamura, and J.W. Streilein.** 1997. High and low doses of hapten dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *Eur.J.Immunol.* 27:442.
204. **Becker, D., A. Reske-Kunz, J. Knop, and K. Reske.** 1991. Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized and expressed by mouse Langerhans cells. *Eur.J.Immunol.* 21:1213.
205. **Enk, A.H., V.L. Angeloni, M.C. Udey, and S.I. Katz.** 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. *J.Immunol.* 151:2390.
206. **Aiba, S. and S. Katz.** 1991. The ability of cultured Langerhans-cells to process and present protein antigens is MHC-dependent. *J.Immunol.* 146:2479.
207. **Aiba, S. and S. Katz.** 1990. Phenotyp and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells. *J.Immunol.* 145:2791.
208. **Enk, A.H., V. Angeloni, M. Udey, and S. Katz.** 1993. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J.Immunol.* 150:3698.
209. **Dekaris, I., S. Zhu, and M.R. Dana.** 1999. TNF-alpha regulates corneal Langerhans cell migration. *J.Immunol.* 162:4235.
210. **Trefzer, U., M. Brockhaus, H. Loetscher, F. Partlow, A. Kapp, E. Schopf, and J. Krutmann.** 1991. 55-kd tumour necrosis factor receptor is expressed by human keratinocytes and plays a pivotal role in regulation of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J.Invest.Dermatol.* 97:911.
211. **Zhuang, L., B. Wang, G. Shinder, G. Shivji, T. Mak, and D.N. Sauder.** 1999. TNF receptor p55 plays a pivotal role in murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation. *J.Immunol.* 162:1440.

212. **Vandenabeele, P., W. Declerq, R. Beyaert, and W. Fiers.** 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biology* 5:392.
213. **FACSCalibur™ System User's Guide.** 1996. Becton Dickinson Immunocytometry Systems Rev. A, San Jose, CA, USA, S. 139.
214. **Santee, S. and L. Owen-Schaub.** 1996. Human tumour necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promotor characterization. *J.Biol.Chem.* 271:21151.
215. **Lewis, M., L. Tartaglia, A. Lee, G. Bennett, G. Rice, G. Wong, E. Chen, and D. Goeddel.** 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2830.
216. **Bader, T. and P. Nettesheim.** 1996. Tumor necrosis factor-alpha modulates the expression of its receptor and several cytokines in rat tracheal epithelial cells. *J.Immunol.* 157:3089.
217. **Hurlé, B., F. Segade, R. Rodriguez, S. Ramos, and P. Lazo.** 1998. The mouse tumor necrosis factor receptor 2 gene: genomic structure and characterization of the two transcripts. *Genomics* 52:79.
218. **Fuchs, P., S. Strehl, M. Dworzak, A. Himmler, and P. Ambros.** 1992. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13. *Genomics* 13:219.
219. **Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber.** 1997. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for migration. *Immunology* 92:388.
220. **Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber.** 1998. Characteristics and regulation of the expression of interleukin-1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes. *Arch.Dermatol.Res.* 290:688.
221. **Enk, A.H. and S. Katz.** 1992. Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J.Invest.Dermatol.* 99:39S.
222. **Roake, J., A. Rao, P. Morris, C. Larson, D. Hankins, and J.M. Austyn.** 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and interleukin-1. *J.Exp.Med.* 181:2237.
223. **Schwarz, A., S. Grabbe, H. Riemann, Y. Aragane, M. Simon, S. Manon, S. Andrade, T.A. Luger, A. Zlotnik, and T. Schwarz.** 1999. *In vivo* effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J.Invest.Dermatol.* 103:211.
224. **Wang, B., L. Zhuang, H. Fujisawa, G. Shinder, C. Feliciani, G. Shivji, H. Suzuki, P. Amerio, P. Toto, and D.N. Sauder.** 1999. Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J.Immunol.* 162:277.
225. **Shornik, L., P. De Togni, S. Mariathasan, J. Goellner, J. Strauss-Schoenberger, R. Karr, T. Ferguson, and D.D. Chaplin.** 1996. Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to TNCB (trinitrochlorobenzene). *J.Exp.Med.* 183:1427.
226. **Wong, B.R., R. Josien, S.Y. Lee, B. Sauter, H. Li, R.M. Steinman, and Y. Choi.** 1997. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J.Exp.Med.* 186:2075.

227. **Anderson, D., E. Maraskovsky, W. Billingsley, W. Dougall, M. Tometsko, E. Roux, M. Teepe, R. DuBose, D. Cosman, and L. Galibert.** 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175.
228. **Josien, R., B.R. Wong, H. Li, R.M. Steinman, and Y. Choi.** 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J.Immunol.* 162:2568.
229. **Nater, J.P. and P.J. Hoedemaker.** 1976. Histologic differences between irritant and allergic patch test reactions in man. *Contact Dermatitis* 2:247.
230. **Willis, C.M., E. Young, D.R. Brandon, and J.D. Wilkinson.** 1986. Immunopathological and ultrastructural findings in human allergic and irritant contact dermatitis. *Brit.J.Dermatol.* 115:305.
231. **Bratsch, J., J. Burgard, and W. Sterry.** 1992. Common pathogenetic pathways in allergic and irritant contact dermatitis. *J.Invest.Dermatol.* 98:166.
232. **Schwarz, A., S. Grabbe, K. Mahnke, H. Riemann, T.A. Luger, M. Wysocka, G. Trinchieri, and T. Schwarz.** 1998. Interleukin-12 breaks ultraviolet light induced immunosuppression by affecting CD8⁺ rather than CD4⁺ T cells. *J.Invest.Dermatol.* 110:272.
233. **Schwarz, A., S. Grabbe, Y. Aragane, K. Sandkuhl, H. Riemann, T.A. Luger, M. Kubin, G. Trinchieri, and T. Schwarz.** 1996. Interleukin-12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J.Invest.Dermatol.* 106:1187.
234. **Pschyrembel.** 1993. *Klinisches Wörterbuch.* de Gruyter, Berlin, S. 915.
235. **Williams, M.B. and E.C. Butcher.** 1997. Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to peyer's patches, lymph nodes and spleen. *J.Immunol.* 159:1746.
236. **Ullrich, S.E., W.B. McIntyre, and J.A. Roberts.** 1990. Suppression of the immune response to alloantigen by factors released from ultraviolet-irradiated keratinocytes. *J.Immunol.* 145:489.
237. **Steinbrink, K., C. Sorg, and E. Macher.** 1996. Low zone tolerance to contact allergens in mice. A functional role for CD8⁺ T helper type 2 cells. *J.Exp.Med.* 183:759.
238. **Fong, T.A.T. and T.R. Mosmann.** 1990. Alloreactive murine CD8⁺ T cells clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J.Immunol.* 144:1744.
239. **Seder, R.A., J.L. Boulay, F. Finkelmann, S. Barbier, S.Z. Ben-Sasson, G. Le Gros, and W.I. Paul.** 1992. CD8⁺ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J.Immunol.* 148:1652.
240. **Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, and et al.** 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to DNFB. *Eur.J.Immunol.* 25:3006.
241. **Desvignes, C., F. Estèves, N. Etchart, C. Bella, C. Czerkinsky, and D. Kaiserlian.** 1998. The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I-restricted CD8⁺ effector T cells *in vivo*. *Clin.Exp.Immunol.* 113:393.
242. **Kondo, S., S. Beissert, and J. Wang.** 1996. Hyporesponsiveness in contact hypersensitivity and irritant contact dermatitis in CD4 gene targeted mouse. *J.Invest.Dermatol.* 106:993.

243. **Anderson, C., A. Hehr, R. Robbinns, R. Hasan, M. Athar, and C.A. Elmets.** 1995. Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J.Immunol.* 155:3530.
244. **Hauser, C.** 1990. Cultures epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact senisitivity. *J.Invest.Dermatol.* 95:436.
245. **Mladenovic, V.L., Z. Domljan, B. Rozman, I. Jajic, D. Mihajlovic, J. Dordevic, M. Popovic, M. Dimitrijevic, M. Zivkovic, G. Campion, P. Musikic, I. Löw-Friedrich, C. Oed, H. Seifert, and V. Strand.** 1995. Safty and effectivness of Leflunomide in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 38:1595.
246. **Zielinski, T., M. Herrmann, H.J. Müller, N. Riedel, and R.R. Bartlett.** 1994. The influence of Leflunomide on cell cycle, IL-2-receptor (IL-2R) and its gene expression. *Agents Actions* 41:C204.

VII. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azino-bis-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
APC	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel (1 Zerfall pro Sekunde)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	complementary DNA
CHS	contacthypersensitivity
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)
Con A	Concanavalin A
Con A Sup	Kulturüberstand von Rattenmilzzellen, die mit Con A kultiviert wurden
Cpm	Counts per minute
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
Cys	Cystein
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazobicyclo-2,2,2-Oktan
DC	dendritische Zelle
DTAF	Dichlortriazinylaminofluorescein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETC	dendritische epidermale T-Zelle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNFB	2,4-Dinitrofluorbenzol
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphate (dCTP, dTTP, dATP, dGTP)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	delayed type hypersensitivity
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM	endothelial leukocyte adhesion molecule
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ES-Zelle	embryonale Stamm-Zelle vom Stamm 129
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F(ab') ₂	bivalentes Antikörperfragment nach Pepsinspaltung
FACS	flourescent activated cell sorter
Fc	konstanter, nicht antigenbindender Teil eines Immunglobulinmoleküls
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	foetale calf serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FSC	forward side scatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-CSF
GTC	Guanidinium thiocyanate, RNase-Inhibitor
h	Stunde
H-2	Histokompatibilitätsantigen 2 (MHC der Maus)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPO	horse radish peroxidase
HS	horse serum
HSA	heat-stable antigen
I-A, I-E	Subregion der MHC Klasse II-Moleküle der Maus
ICAM	intercellular adhesion molecule
IDC	interdigitierende dendritische Zelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin mit γ -Kette
IgM	Immunglobulin mit μ -Kette
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin 2
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IP-10	IFN-induced protein 10
I.U.	international unit
kb	Kilobasenpaar (1 kb = 1000 bp)
KC	Keratinocytes
kD	Kilo-Dalton (1000 g x mol ⁻¹)
lac	Die lac-Gene von <i>E.coli</i> beinhalten einen Operator und drei Strukturgene
LC	Langerhans-Zelle
LF	Leflunomid
LFA	lymphocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
M	Molar (6,022 x 10 ²³ Teilchen)
mA	Milli-Ampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MELR	Mixed epidermal lymphocyte reaction
MEM	minimal essential medium
Mest	Mouse ear swelling test
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
MHC	major histocompatibility complex
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NKS	normales Kaninchenserum
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NO	nitric oxide
OD	optische Dichte
PBMC	periphere-Blut-mononucleare Zellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
PHA	Phytohämagglutinin

PMA	Phorbolester-myrestat-acetat
QR	Quantum red
rh	rekombinant-human
rm	rekombinant-murin
RAG	recombination activating genes
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SALT	skin associated lymphoid tissue
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Ratten-Serum-Faktor
SIS	skin immune system
Speed-Vac	Vakuum-Zentrifuge
SRBC	sheep-red-blood-cell
SSC	standard saline-citrate, Standardpuffer der Molekulargenetik
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-cell-receptor
TGF	transforming growth factor
Th1 oder Th2	Subpopulation der T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor necrosis factor
TNCB	Trinitrochlorbenzol
TNFR	Tumour Necrose Faktor Rezeptor
Th	T-Helferzellen
Tm	Schmelztemperatur der DNA. Die Hälfte aller Nucleinsäure-Moleküle in einer Lösung liegen in der doppelsträngigen Form, die anderen als Einzelstrang-Moleküle vor.
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VC	veiled cells oder verschleierte Zellen
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late activation antigen
W	Watt
X63-Sup	IL-2 haltiger Kulturüberstand von X63Ag8.653-Zellen
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

VIII. Anhang

TNFR1-mRNA:

Das Gen besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Die einzelnen Exons sind durch abwechselnde fette und normale Schriftstärken dargestellt. Zusätzlich wurden die Bindungsstellen der verwendeten Primer sowie der Translationstart eingezeichnet. [GenBank accession number M60468]

Sequenz: 2048 bp; (Basenanteile: 444 A; 598 C; 551 G; 455 T)

```

5' -TGAGGGGTGC GAGGTCCTGG AGGACCGTAC CCTGATCTCT ATCTGCCTCT GACTTTCAGC      60

TTCTCGAACT CGAGGCCAG GCTGCCATCG CCGGGCCAC CTGGTCCGAT CATCTTACTT      120

CATTACAGAG CGTTGTCAAT TGCTGCCCTG TCCCAGCCC CAATGGGGGA GTGAGAGGCC      180
      ↓ Translationstart
ACTGCCGGCC GGACATGGGT CTCCCCACCG TGCCTGGCCT GCTGCTGTCA CTGGTGCTCC      240
      Exon 1
TGGCTCTGCT GATGGGGATA CATCCATCAG GGGTCACTGG ACTAGTCCCT TCTCTTGGTG      300
      Exon 2
ACCGGGAGAA GAGGGATAGC TTGTGTCCCC AAGGAAAGTA TGTCCATTCT AAGAACAATT      360

CCATCTGCTG CACCAAGTGC CACAAAGGAA CCTACTTGGT GAGTGACTGT CCGAGCCCAG      420
      Exon 3
GGCGGGATAC AGTCTGCAGG GAGTGTGAAA AGGGCACCTT TACGGCTTCC CAGAATTACC      480

TCAGGCAGTG TCTCAGTTGC AAGACATGTC GGAAAGAAAT GTCCAGGTG GAGATCTCTC      540
      Exon 4
CTTGCCAAGC TGACAAGGAC ACGGTGTGTG GCTGTAAGGA GAACCAAGTTC CAACGCTACC      600
      TNFR1II-1
TGAGTGAGAC ACACTTCCAG TGCCTGGACT GCAGCCCCTG CTTCAACGGC ACCGTGACAA      660

TCCCCTGTAA GGAGACTCAG AACACCGTGT GTAACTGCCA TGCAGGGTTC TTTCTGAGAG      720
      Exon 5
AAAGTGAGTG CGTCCCTTGC AGCCACTGCA AGAAAAATGA GGAGTGATG AAGTTGTGCC      780
      TNFR1II-2      Exon 6
TACCTCTCC GCTTGCAAAT GTCACAAACC CCCAGGACTC AGGTACTGCG GTGCTGTTGC      840
      Exon 7
CCCTGTTAT CTTGCTAGGT CTTTGCCTTC TATCCTTTAT CTTTATCAGT TTAATGTGCC      900

GATATCCCCG GTGGAGGCC GAAGTCTACT CCATCATTTG TAGGGATCCC GTGCCTGTCA      960
      Exon 8
AAGAGGAGAA GGCTGGAAAG CCCCTAACTC CAGCCCCCTC CCCAGCCTTC AGCCCCACCT      1020
      Exon 9
CCGGCTCAA CCCCCTCTG GGCTTCAGCA CCCCAGGCTT TAGTTCTCCT GTCTCCAGTA      1080

```

CCCCATCAG CCCCATCTTC GGTCTAGTA ACTGGCACTT CATGCCACCT GTCAGTGAGG	1140
TAGTCCCAAC CCAGGGAGCT GACCCTCTGC TCTACGAATC ACTCTGCTCC GTGCCAGCCC	1200
CCACCTCTGT TCAGAAATGG GAAGACTCCG CCCACCCGCA ACGTCCTGAC AATGCAGACC	1260
	Exon 10
TTGCGATTCT GTATGCTGTG GTGGATGGCG TGCCTCCAGC GCGCTGGAAG GAGTTCATGC	1320
GTTTCATGGG GCTGAGCGAG CACGAGATCG AGAGGCTGGA GATGCAGAAC GGGCGCTGCC	1380
TGCGCGAGGC TCAGTACAGC ATGCTGGAAG CCTGGCGGCG CCGCACGCCG CGCCACGAGG	1440
ACACGCTGGA AGTAGTGGGC CTCGTGCTTT CCAAGATGAA CCTGGCTGGG TGCCTGGAGA	1500
	TNFR1I-1 Ende des Exon 10 ↓
ATATCCTCGA GGCTCTGAGA AATCCCGCCC CCTCGTCCAC GACCCGCCTC CCGCGATAAA	1560
GCCACACCCA CAACCTTAGG AAGAGGGACT TGAACTTCAA GGACCATCCT GCTAGATGCC	1620
CTACTCCCTG TGGGTGAAAA GTGGGCAAAG GTCTCTAAGG GGAAGGCTC GAGCTGGTAG	1680
CCACTTCCTT GGTGCTACCG ACTTGGTGTA CATAGCTTTT CTCAGCCGCC GAGGACTGCC	1740
TGAGCCAGCC ACTTGTGAGT GGCAGGGAGA TGTACCATCA GCTCCTGGCC AGCTGAGGGT	1800
	TNFR1I-2
GCCAAAGACA GGATTGTAGA GGAAAGGCAC AATGTATCTG GTGCCCACTT GGGATGCACA	1860
GGGCCCAAGC CAAGCTTCTC AGGGCCTCCT CAGTGGGTTT CTGGGCCTTT TTCACTTTTG	1920
ATAAGCAATC TTTGTATCAA TTATATCACA CTAATGGATG AACTGTGTAA GGTAAGGACA	1980
AGCATAGAAA GCGGGGTCT CCAGCTGGAG CCCTCGACTC TTGTAAATAC ACTAAACGTC	2040
TAAAAATG-3'	2048

TNFR2-mRNA:

Das Gen besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Die einzelnen Exons sind durch abwechselnde fette und normale Schriftstärken dargestellt. Zusätzlich wurden die Bindungsstellen der verwendeten Primer eingezeichnet. [GenBank accession number M60469]

Sequenz: 1505 bp; (Basenanteile: 347 A; 459 C; 408 G; 291 T)

```

5' -TCTAGCTCCA GGCACAAGGG CGGGAGCCAC CGCTGCCCCCT ATGGCGCCCC CCGCCCTCTG      60
      Exon 1
GGTCGCGCTG GTCTTCGAAC TGCAGCTGTG GGCCACCGGG CACACAGTGC CCGCCAGGT      120
      Exon 2
TGTCTTGACA CCCTACAAAC CGGAACCTGG GTACGAGTGC CAGATCTCAC AGGAATACTA      180
TGACAGGAAG GCTCAGATGT GCTGTGCTAA GTGTCCTCCT GGCCAATATG TGAAACATTT      240
      Exon 3
CTGCAACAAG ACCTCGGACA CCGTGTGTGC GGAAGCATGT ATACCCAGGT      300
CTGGAACCAG TTTCGTACAT GTTTGAGCTG CAGTTCTTCC TGTACCACTG ACCAGGTGGA      360
      Exon 4
GATCCGCGCC TGCATAAAC AGCAGAACCG AGTGTGTGCT TCGAAGCTG GCAGGTACTG      420
CGCCTTGAAA ACCCATTCTG GCAGCTGTGC ACAGTGCATG AGGCTGAGCA AGTGCGGCC      480
TGGCTTCGGA GTGGCCAGTT CAAGAGCCCC AAATGGAAAT GTGCTATGCA AGGCCTGTGC      540
      Exon 5
CCCAGGGACG TTCTCTGACA CCACATCATC CACTGATGTG TGCAGGCCCC ACCGCATCTG      600
      Exon 6
TAGCATCCTG GCTATTCCCG GAAATGCAAG CACAGATGCA GTCTGTGCGC CCGAGTCCCC      660
AACTCTAAGT GCCATCCCAA GGACACTCTA CGTATCTCAG CCAGAGCCCA CAAGATCCCA      720
ACCCCTGGAT CAAGAGCCAG GGCCCAGCCA AACTCCAAGC ATCCTTACAT CGTTGGGTTT      780
AACCCCATTT ATTGAACAAA GTACCAAGGG TGGCATCTCT CTTCCAATTG GTCTGATTGT      840
      Exon 7
TGGAGTGACA TCACTGGGTC TGCTGATGTT AGGACTGGTG AACTGCATCA TCCTGGTGCA      900
GAGGAAAAAG AAGCCCTCCT GCCTACAAAG AGATGCCAAG GTGCCTCATG TGCCTGATGA      960
      Exon 8
GAAATCCAG GATGCAGTAG GCCTTGAGCA GCAGCACCTG TTGACCACAG CACCCAGTTC      1020
      TNFR2I-1
CAGCAGCAGC TCCCTAGAGA GCTCAGCCAG CGCTGGGGAC CGAAGGGCGC CCCTGGGGG      1080
CCATCCCAA GCAAGAGTCA TGGCGGAGGC CCAAGGGTTT CAGGAGGCC GTGCCAGCTC      1140
CAGGATTCA GATTCTTCCC ACGGAAGCCA CGGGACCCAC GTCAACGTCA CTTGCATCGT      1200

```

Exon 10

<u>GAACGTCTGT AGCAGCTCTG</u> ACCACAGTTC TCAGTGCTCT TCCCAAGCCA GCGCCACAGT	1260
TNFR2II-2	
GGGAGACCCA GATGCCAAGC CCTCAGCGTC CCCAAAGGAT GAGCAGGTCC <u>CCTTCTCTCA</u>	1320
<u>GGAGGAGTGT CCGTCTCAGT</u> CCCCGTGTGA GACTACAGAG ACACTGCAGA GCCATGAGAA	1380
TNFR2I-2	
GCCCTTGCCC CTTGGTGTGC CGGATATGGG CATGAAGCCC AGCCAAGCTG GCTGGTTTGA	1440
TCAGATTGCA GTCAAAGTGG CCTGACCCCT GACAGGGGTA ACACCCTGCA AAGGGACCCC	1500
CGAGA-3'	1505

Anordnung der Primer und die Produktgröße:

