Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, GSF/TUM
ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt.
Technische Universität München

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

Mechanismen der allergischen Ekzem-Reaktion

Eine morphologisch und im Allergen-spezifischen *in vitro* Ekzem-Modell angestellte Charakterisierung der Interaktionen zwischen Keratinozyten und T-Zellen

Kilian Eyerich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:
1. Priv.-Doz. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt
3. Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 09.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007 angenommen.

I Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Titel	Seite
II	**Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit**	**III**
III	**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**	**V**
1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Übersicht	1
1.2	Historisches zur Allergie	2
1.3	An der allergischen Ekzem-Reaktion beteiligte Zelltypen	2
1.3.1	T-Lymphozyten	2
1.3.2	Keratinozyten	6
1.4	Allergisch-ekzematöse Manifestationen an der Haut	8
1.4.1	Das atopische Ekzem	8
1.4.2	Die allergische Kontaktdermatitis	11
1.5	Die Limitierung der allergischen Reaktion	13
2.	**Ziel der Arbeit**	**15**
3.	**Materialien und Methoden**	**16**
3.1	Materialien	16
3.1.1	Probanden	16
3.1.2	Biologisches Material	18
3.1.3	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	18
3.1.4	Verwendete Medien	23
3.2	Methoden	25
3.2.1	Immunhistochemie	25
3.2.1.1	Allergen-Provokation	25
3.2.1.2	Gewinnung und Aufbereitung der Biopsien	25
3.2.1.3	Färbung	26
3.2.1.4	Quantifizierung und statistische Analyse	27
3.2.2	Zellkultur	28
3.2.2.1	Generierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone	28
3.2.2.2	Kultivierung humaner, primärer Keratinozyten	36
3.2.2.3	Generierung Dendritischer Zellen	38
3.2.2.4	Kokultur-Experimente	38
4.	**Ergebnisse**	**41**
4.1	Immunhistochemie	41
4.1.1	Klinische Parameter	41
4.1.2	Histologie: Nachweis eines entzündlichen Infiltrates in den Positiv-Biopsien (Gruppe I und II)	42
4.1.3	Immunhistochemie: Charakterisierung des entzündlichen Infiltrates	44
4.1.4	Beteiligung des innaten Immunsystems	46
4.1.5	Allergen-Präsentation	47
4.1.6	Zytokinproduktion der Immunzellen	49

Kapitel	Titel	Seite
4.2	*In vitro*-Ekzem-Modell	52
4.2.1	Proliferation der T-Zell-Linien	52
4.2.2	Wachstum und Charakterisierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone	53
4.2.3	Koinkubation von Allergen-spezifischen T-Zellen und autologen Keratinozyten: morphologisches Bild	60
4.2.4	Beeinflussung der Proliferation und Aktivierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone durch Keratinozyten	64
4.2.5	Beeinflussung des Effekts durch unterschiedliche Vorbehandlung und Verwendung heterologer Keratinozyten	67
5.	**Diskussion**	**70**
5.1	Pollen – Aeroallergene als Auslöser einer Ekzemreaktion	71
5.1.1	Klinischer und histologischer Vergleich der Ekzem-reaktionen, Kinetik	71
5.1.2	Immunhistochemische Charakterisierung des proinflam-matorischen mononukleären Infiltrates	72
5.1.3	Das Zytokin-Profil der infiltrierenden T-Zellen	74
5.1.4	Die Allergen-Präsentation im Entzündungsgebiet	75
5.1.5	Das Bild der negativen Patch-Tests und der chronischen Läsion	77
5.1.6	Ein Konzept zur Effektorphase des polleninduzierten Ekzems	78
5.2	Keratinozyten: Immunmodulatoren der Ekzemreaktion	80
5.2.1	Etablierung des autologen, Allergen-spezifischen Ekzem-Modells	82
5.2.2	Morphologie der Zell-Zell-Interaktionen	85
5.2.3	Beeinflussung der Proliferation von T-Zellen durch Keratinozyten	86
5.2.4	Modulation des Zytokinprofils	88
5.2.5	Hypothese: Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen von Keratinozyten und T-Zellen in der Ekzemreaktion	89
6.	**Zusammenfassung**	**94**
IV	**Literaturverzeichnis**	**VII**
V	**Dank**	**XXIII**
VI	**Lebenslauf**	**XXIV**
VII	**Anhang: Immunhistochemische Färbungen**	**XXV**
	Daten zu den gezeigten Graphen	**XXXV**

II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit

Vorträge auf Kongressen:

Eyerich K, Huss-Marp J, Darsow U, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Delayed type hypersensitivity reactions to pollen derived factors. International symposium on atopic dermatitis (III. Rajka Symposium), 29.-31. August 2003, Rom, J Invest Dermatol. 2003 Nov; 121 (5): 1257

Eyerich K, Huss-Marp J, Darsow U, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Delayed type hypersensitivity reactions to pollen derived factors. 16. Mainzer Allergie-Workshop, 12.-13. März 2004, Allergo J 2004; 13:50 (Vortrag 74)

Stefanie Förster, Kilian Eyerich, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann, Keratinocytes act as immune modulators in the effector phase of acute allergic reactions, Vortrag, 17. Mainzer Allergieworkshop, 11.-12. März 2005, Allergo Journal 2005

Huss-Marp J, Eyerich K, Darsow U, Wollenberg A, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C Immunhistochemical analysis of the eczematous reaction to native pollen grains. Vortrag, 17. Mainzer Allergieworkshop, 11.-12. März 2005, Allergo Journal 2005; 1:43

Posterpräsentationen auf Kongressen:

Eyerich K, Huss-Marp J, Darsow U, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Delayed type hypersensitivity reactions to pollen derived factors. XXII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, EAACI 2003, 7-11Juni, Paris, J Allergy Clin Immunol Vol. 58 –Suppl. 74– 2003, Abstrakt 855

Eyerich K, Huss-Marp J, Darsow U, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Delayed type hypersensitivity reactions to pollen derived factors. XXXI. Annual meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 26.-28. Februar 2004, Dresden, Arch Derm Res. 2004 Feb; 295 (8-9): 332 (Poster 006)

Stefanie Förster, Kilian Eyerich, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann, Katinocytes act as immune modulators in the effector phase of acute allergic reactions. World Allergy Congress, 23.Juni-01.Juli 2005, München

Eyerich K, Huss-Marp J, Darsow U, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C. Delayed type hypersensitivity reactions to pollen derived factors. World Allergy Congress, 23.Juni-01.Juli 2005, München

III Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AE	Atopisches Ekzem
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
APE	aqueous pollen extract
APT	Atopie Patch Test
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bet.	Betula alba
BFA	Brefeldin A
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Cirka
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte associated antigen
cpm	Counts per minute
DC	Dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
Foxp3	Forkhead box p3
g	Gravitation
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor
gr	griechisch
h	Stunde(n)
HHV	Humanes-Herpes-Virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
IFN-γ	Interferon-γ
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LC	Langerhans-Zelle
LMP-1	Latent membrane protein 1

MACS	Magnetic antibody column separation
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTP	Mikrotiterplatte
mRNA	messenger Ribo-Nucleic-Acid
nm	Nanometer
NF-κB	Nuclear factor κB
NGF	Nerve growth factor
PBMC	Periphere blood mononuclear cell
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PHA	Phythämagglutinin (= Lectin)
PI	Proliferationsindex
PPT	Pollen Patch Test
Phl.	Phleum pratense L.
PP	Poly-Propylen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
R	Rezeptor
rpm	Rounds per minute
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
sec	Sekunde(n)
Stat	signal transducer and activator of transcription
Tc1	Zytotoxische T-Zelle vom Typ 1
Tc2	Zytotoxische T-Zelle vom Typ 2
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
T-reg	T regulatorische Zelle
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TSLP	Thymus-Stroma Lymphopoeitin
U	Unit(s)
UV	Ultra-violett
vgl	vergleiche
vgl u	vergleiche unten
MTP	Mikrotiterplatte

1 Einleitung

1.1 Übersicht

Die Inzidenz allergischer Hauterkrankungen, insbesondere des atopischen Ekzems, hat in der westlichen Welt in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen [9,10, 18], was für die Gesellschaft eine Zunahme der ökonomischen Relevanz, besonders im Bereich der Arbeits- und Sozialmedizin [85], nach sich zieht.
Zu den häufigsten Hauterkrankungen zählt neben dem erwähnten atopischen Ekzem das allergische Kontaktekzem [40], das ebenfalls mit erheblichen sozial-medizinischen Kosten verbunden ist [115].
Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Allergie der letzten Jahre konnten die Pathophysiologie der Entstehung dieser überschießenden oder fehlgeleiteten Immunantworten weitgehend aufklären. Das Hauptaugenmerk der Forschung war dabei bislang auf die erste, klinisch nicht manifeste Phase der Allergie, die Sensibilisierungsphase, gerichtet.
Weniger erforscht ist bisher die Effektorphase, die mit den klinischen Symptomen wie starkem Juckreiz und ekzematösen Hautveränderungen verbunden ist.
Das atopische Ekzem und die allergische Kontaktdermatitis sind dermatologische Erkrankungen mit sehr ähnlichen klinischen Manifestationsformen, denen unterschiedliche Pathophysiologien zugrunde liegen. Die genannten Erkrankungen sollen in dieser Arbeit vergleichend beurteilt werden: zum einen die allergische Kontaktdermatitis, eine allergische Hautreaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell [31] auf niedermolekulare Stoffe (Haptene) wie Nickel, zum anderen das atopische Ekzem, das bei einer Subgruppe von Patienten mit Typ I-Allergien wie Pollen durch eben diese Allergene ausgelöst und unterhalten werden kann („Atopie Patch Test“), [82,112].
Diese Arbeit wird sich mit den Mechanismen, die zur Ekzem-Entstehung bei allergischen Hauterkrankungen führen, beschäftigen. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Limitierung dieser entzündlichen Hautreaktion gerichtet sein.
Dabei soll die Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Zellen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Im Folgenden sollen deshalb der aktuelle Wissenstand und die gängigen Hypothesen zu diesen Zelltypen sowie der erwähnten Erkrankungen dargestellt werden.

1.2 Historisches zur Allergie

Allergie ist kein Phänomen der Neuzeit: so sind aus dem alten Rom Schriften, beispielsweise von Plinius dem Jüngeren, erhalten, die bei Angehörigen des julisch-claudischen Kaiserhauses typische Symptome beschreiben: demnach könnte Kaiser Augustus sowohl an allergischer *Rhinokonjunktivits* und *Asthma bronchiale* wie auch einem atopischen Ekzem gelitten haben, Claudius an *Rhinokonjunktivitis* und Britannicus an einer Pferdehaar-Allergie [113].
Erst im 19. Jahrhundert aber wurden die beschriebenen Symptome systematisiert und klassifiziert: 1819 durch Beschreibung und (spätere) Namensgebung des Heuschnupfens durch John Bostock, 50 Jahre später durch Charles Blackley, der in einem Selbstversuch den Zusammenhang zwischen Pollen-Exposition und dem Auftreten allergischer Symptome nachwies und schließlich durch die zwei Wiener Pädiater Clemens von Pirquet und Bela Schick, die 1906 den Begriff „Allergie“ (von gr. allos: anders und ergon: Arbeit), [22] prägten.
Erste Untersuchungen zur anaphylaktischen Reaktion stellten Charles Richet und Paul Portier, dem dafür 1913 der Nobelpreis verliehen wurde, Anfang des 20. Jahrhunderts in Tierversuchen mit dem Gift von Quallen an; sie schufen auch den Begriff „Anaphylaxie“ (von gr. ana: daneben, phylaxis: Schutz), [91].
Der Überbegriff „Atopie“ (von gr. atopos: am falschen Ort) schließlich geht auf Coca und Cooke zurück, die 1923 einen Vorschlag zur Klassifizierung allergischer Erkrankungen machten [29].
Mit der Identifizierung von an diesen Reaktionen beteiligten Molekülen wie dem Immunglobulin E im Jahre 1967 [66] schließlich wurde die Ära der klinischen Immunologie eingeleitet.

1.3 An der allergischen Ekzem-Reaktion beteiligte Zelltypen

1.3.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind (mit Ausnahme der Natürlichen Killerzellen) Immunzellen, die dem adaptiven Arm des Immunsystems zugerechnet werden. Man unterscheidet zwischen CD4 positiven (Th-Zellen) und CD8 positiven (Tc-Zellen) T-Lymphozyten,

beide wiederum werden in naive Vorläuferzellen (Th0/ Tc0) sowie T-Zellen vom Typ 1 (Th1/ Tc1), solche vom Typ 2 (Th2/ Tc2) und T-regulatorische Zellen (T-reg, Th3, Tr1) unterteilt.

Das Th1 – Th2-Konzept und seine Regulation

Typ1-Zellen sind charakterisiert durch die Produktion bestimmter Zytokine (Interferon-γ und Lymphotoxin). Sie bekämpfen effektiv Bakterien und Viren, während Helminthen und andere gastrointestinale Parasiten durch Typ2-Zellen vernichtet werden, die die Zytokine Interleukin-4, -5, -10 und -13 synthetisieren und ausschütten.

Der Regulation dieser beiden Arme der T-Zell-Antwort liegen komplexe Mechanismen zugrunde. Ein wichtiger Faktor bei der Polarisierung sind Zytokine, vor allem das von aktivierten Makrophagen und DC ausgeschüttete Interleukin-12, das die Differenzierung naiver T-Zellen zu Typ1-Zellen bewirkt [65,90,102], daneben das ebenfalls eine Typ1-Antwort fördernde Interferon-α [20] und das Interleukin-4, das eine Typ2-Antwort begünstigt [19,62,84,127]. Die Bedeutung von Interleukin-4 wird allerdings kontrovers diskutiert, da auch in seiner kompletten Abwesenheit eine Typ2-Immunantwort entstehen kann [104] und umgekehrt in Mäusen, bei denen Interleukin-4 ausgeschaltet worden war, Defekte in Typ1-Immunantworten nachgewiesen werden konnten [119,139]. Der letztgenannte Effekt des Interleukin-4 könnte auf der Induktion von Interleukin-12 in DC beruhen [64].

Die Zytokine binden dabei an die Membranen naiver T-Zellen; das Signal wird intrazellulär über Transkriptionsfaktoren weitergeleitet, von denen ebenfalls einige eine wichtige Rolle bei der Polarisierung in Richtung Typ1- oder Typ2-Immunantwort spielen. So wird durch Bindung an den Interleukin-12-Rezeptor das Molekül Stat4 aktiviert [74], das ebenso wie aktiviertes Stat1 über den Transkriptionsfaktor T-bet die Produktion von Interferon-γ und eine Differenzierung zu Typ1-Zellen bewirkt [2]. Die wichtigsten Signaltransduktoren der Typ2-Antwort sind Stat6, das GATA-3 aktiviert [43,162] und c-Maf, das hauptsächlich die Ausschüttung von Interleukin-4 bewirkt [63].

Wichtige Quellen dieser polarisierenden Zytokine sind Antigen-präsentierende Zellen (APC), von denen Subtypen mit unterschiedlichen Aufgaben beschrieben wurden: die von einer myeloiden Vorläuferzelle abstammenden reifen DC1-Zellen, die sich durch Expression der Marker CD11c, CD11b, CD14 und CD45RO von den weniger

häufig vorkommenden DC2 unterscheiden, zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Interleukin-12 zu produzieren und somit eine Typ1-Antwort zu fördern [94]. Dagegen stammen die erwähnten DC2-Zellen (plasmazytoide DC, pDC) von lymphoiden Vorläuferzellen ab und können eine Typ2-Immunantwort begünstigen [114]. Dieses Modell ist jedoch stark vereinfachend: so konnte, abhängig vom stimulierenden Agens, sowohl eine Typ2-Promotion durch DC1 [133] als auch eine Typ1-Polarisierung durch pDC [27] nachgewiesen werden.

Für die Aktivierung einer T-Zelle durch Antigen-präsentierende Zellen ist neben der spezifischen T-Zell-Rezeptor/MHC-Bindung ein kostimulatorisches Signal erforderlich; bedeutende kostimulatorische Moleküle sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf aktivierten DC präsentiert werden und auf der T-Zelle an CD28 binden. Ein einfaches Paradigma geht von einer Polarisierung in Typ1-Richtung bei Bindung von B7.1 und einer solchen in Typ2-Richtung bei Bindung von B7.2 aus [80,121]; dass auch diese Theorie eine Vereinfachung der wahren Verhältnisse darstellt, wird aus der Tatsache deutlich, dass eine Blockierung von B7.2 auch in einer Reduktion von Typ1-vermittelten Immunantworten resultieren kann [158]. Diese Widersprüche werden durch die Komplexität der Interaktionen zwischen APC und T-Zellen, die auch stark Stimulus-abhängig sind [34], erklärt.

T-regulatorische Zellen

T-reg-Zellen sind an der Limitierung der allergischen Reaktion beteiligt (vgl. Abb. 1.3-1 und 1.3-2). Es handelt sich um eine regelmäßig auftretende Subpopulation CD4+ T-Zellen („naturally occuring Tregs“), die den IL-2-Rezeptor (CD25) exprimiert und sich durch die Bildung des Zytokins Interleukin-10 [25,122] und des Gewebs-Wachstumsfaktors-β (TGF-β), [71] auszeichnet. T-reg-Zellen reifen im Thymus bei Aktivierung des spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 [72,125]. Sie können naive T-Zellen Allergen-spezifisch und konzentrationsabhängig in drei verschiedenene Richtungen differenzieren: durch Induktion von Toleranz in aktivierten Th-Zellen [5,26] oder Differenzierung naiver CD4+ -Zellen zu entweder IL-10 produzierenden Tr1-Zellen oder TGF-β exprimierenden Th3-Zellen [44,150]. Die letztgenannten induzierten T-Zellen („inducible Tregs“) sind wiederum in der Lage, in der Peripherie andere CD4+ T-Zellen über lösliche Faktoren in Anergie zu bringen („infectious tolerance“), [71]. Daneben sind T-reg-Zellen in der Lage, die Produktion von

proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IFN-γ und IL-6 durch aktivierte Monozyten und Makrophagen zu inhibieren [130].
T-reg-Zellen exprimieren ein großes Potential an Typ1- und Typ2-Chemokinen und zeichnen sich durch eine geringe Produktion der Zytokine Interleukin-4 und Interferon-γ aus [122]. Die Bedeutung der T-reg-Zellen wurde sowohl bei Typ I-Allergien [145] als auch bei Allergien vom verspäteten Typ, den Typ IV-Allergien, nachgewiesen [26]; die Tatsache, dass die Quantität an T-reg-Zellen bei Allergikern reduziert ist, führte sogar zu dem Postulat: „Allergie entspricht einer unzureichenden Anzahl an T-reg“ [5]. Sicher ist, dass T-reg-Zellen eine Rolle bei der spezifischen Immuntherapie spielen, wo sie induziert werden [72]. Ein möglicher Ansatz, die entzündungshemmende Wirkung von Kortikosteroiden zu erklären, scheint ein Eingreifen dieser Steroide in die Reifung von T-reg-Zellen über den Glukokortikoid-induzierten-TNF-Rezeptor-verwandten-Rezeptor (GITR) zu sein [156].

Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen erkennen chemische und mikrobiologische Antigene als Fragmente von Makromolekülen, wenn sie an bestimmte Proteine Antigen-präsentierender Zellen gebunden sind; so werden Peptid-Antigene in MHC-restringierter, nicht-Peptid-Antigene mittels CD1 über den für jede einzelne T-Zelle spezifischen Rezeptor (TCR) gebunden; andere Moleküle, so genannte Haptene, sind so klein, dass sie erst durch die Bindung an körpereigene Proteine wie dem Albumin zu Vollantigenen werden.
Trifft eine Antigen-präsentierende Zelle (wie etwa residente Langerhans-Zellen in der Epidermis) auf ein Antigen, migriert sie in nahegelegene Lymphknoten, präsentiert dort das in Endosomen prozessierte Antigen den Lymphozyten und exprimiert zusätzlich kostimulatorische Moleküle, die an bestimmte Rezeptoren der T-Zelle binden. Bekannte Kofaktoren sind die B7-Proteine, die an CD28 binden, daneben die Interaktion von CD70 und CD27, CD40 und CD40L, CD58 und CD2 sowie LFA-1 und ICAM-1 [46].
Die Kombination aus der Bindung des MHC-gekoppelten spezifischen Antigens mit dem T-Zell-Rezeptor und der Vermittlung des kostimulatorischen Signals führt zur Expression von sogenannten Adressinen, im Falle der Haut von „skin homing factors“ wie dem „Cutaneous lymphocyte associated antigen“ (CLA), [106] oder den Chemokinrezeptoren CCR4 [41,116] und CXCR3 (bei der Psoriasis), [116] und zur

Aktivierung, klonalen Expansion und Reifung der naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen.
Bei erneutem Antigenkontakt kommt es über das Zusammenspiel aus CLA, Selektin, Integrinen und Chemokinen (synthetisiert von Endothelzellen und Keratinozyten) zur Migration dieser Gedächtniszellen in die Haut [50]. Potentiell gibt es für jedes denkbare Antigen im Körper einige wenige spezifische T-Zellen. Der Kontakt zwischen einer ein Antigen präsentierenden Zelle und der für dieses Antigen spezifischen T-Zelle wird durch die ständige Zirkulation der T-Zellen im Blut- und Lymphsystem gewährleistet [1,115].

1.3.2 Keratinozyten

Die Bedeutung von Keratinozyten für das Immunsystem wurde lange unterschätzt. Heute wird zunehmend deutlich, dass diese Zellen auf empfindliche Weise in den oben beschriebenen Prozess der Entzündung eingebunden sind. Sie können mit einem Arsenal an Boten- und Mediatorstoffen abhängig vom Stimulus die Ekzemreaktion lenken und leiten.

Initiierung der Entzündungsreaktion, Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen
Die während einer dermo-epidermalen Entzündungsreaktion durch T-Zellen und APC ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine, aber auch Rezeptoren des innaten Immunsystems wie TLR (Toll-like receptors), an die mikrobielle Bestandteile gebunden haben, oder UV-Licht aktivieren die Keratinozyten. Sie erhöhen daraufhin die Ausschüttung der Zytokine Interleukin-1β (IL-1β), [57] und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), [78], Zytokine, die über den Transkriptionsfaktor NF-κB („nuclear factor-κB“) die autokrine Synthese und Ausschüttung von zahlreichen Botenstoffen bewirken, die die Rekrutierung, Aktivierung und schließlich Anlagerung von Immunzellen zur Folge haben.
So kommt es zur Expression von Adhäsionsfaktoren wie dem MHC-II [140,143], ICAM-1 [21] und VCAM-1; daneben werden die Migration von Immunzellen fördernde Substanzen wie Selektin und dem Chemokin CXCL-8 (früher Interleukin-8), [67,93], außerdem Komponenten des innaten Immunsystems, so genannte Defensine, ausgeschüttet. Darüber hinaus synthetisieren aktivierte Keratinozyten GM-CSF, das

als Wachstumsfaktor für Granulozyten und Makrophagen wirkt, Interleukin-7 [61] und -15 [58], die T-Zell-trophisch wirken und schließlich Interleukin-6, das auto- und parakrin die Proliferation von Keratinozyten stimuliert [118].

Immunmodulation durch Keratinozyten

Keratinozyten sind an der oben beschriebenen Regulation des Typs der Immunantwort beteiligt. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Expression von Interleukin-12, das ein wichtiger Th1-Induktor ist [12]; die Produktion dieses Zytokins durch Keratinozyten wird durch bestimmte Allergene wie Nickel bei der allergischen Kontaktdermatitis ausgelöst [95,159].

Die Bedeutung des ebenfalls von Keratinozyten ausgeschütteten Interleukin-18 ist noch nicht völlig geklärt; gesichert ist die Polarisierung der Immunantwort in Richtung Typ1, in Abwesenheit von Interleukin-12 kann es aber auch eine Typ2-Antwort triggern [97,98]; daneben werden parakrine Effekte, beispielsweise bei der Wundheilung, diskutiert [73].

Der prominenteste Gegenspieler von Interleukin-12 ist Interleukin-10. Es inhibiert die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1β und Interleukin-12 [33] und damit eine Differenzierung in Typ1-Richtung. Darüber hinaus existieren Berichte, dass APC naive T-Zellen in Anwesenheit von Interleukin-10 zur Produktion von Interleukin-4 und damit zu Typ2-Zellen differenzieren [88]. Ob humane Keratinozyten Interleukin-10 synthetisieren, ist umstritten; während einige Gruppen zu diesem Ergebnis kamen [54,109], beschreibt eine andere das Fehlen von Interleukin-10 mRNA und Protein [135].

Die Modulation der Immunantwort durch Keratinozyten ist extrem sensibel: so kann im Maussystem beispielsweise die Wellenlänge von UV-Licht den Ausschlag in Th1- (UVB) oder Th2- (UVA) Richtung geben [110].

Keratinozyten exprimieren die ebenfalls immunmodulatorisch wirkenden Zytokine Interleukin-4 und -2 nicht, wohl aber deren Rezeptoren [12]. Für Interleukin-4 konnte gezeigt werden, dass es die durch TNF-α und IFN-γ in Keratinozyten induzierte Expression von Th1-Chemokinen wie I-Tac und CXCL-10 in einer additiven Wirkung verstärkt [6]. Dagegen ist der Effekt von IL-2 auf Keratinozyten unklar; es wird eine antiapoptotische Wirkung auf Keratinozyten durch IL-2 diskutiert [117].

Die Terminierung der Zell-Zell-Interaktionen

Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ [108], aber auch UVB-Strahlen [89] bewirken in Keratinozyten die vermehrte Expression von Todesrezeptoren wie Fas und TRAIL-R (TNF related apoptosis inducing ligand receptor) und können so direkt deren Wachstum stoppen und Differenzierungsgrad erhöhen [14] und indirekt die Apoptose-Induktion durch T-Zellen fördern [143]. Somit macht ein Entzündungsmilieu die Keratinozyten durch aktive Prozesse anfälliger für Apoptose.

Auf der anderen Seite aber können Keratinozyten auch Apoptose-induzierende Moleküle wie Granzym B, Fas Ligand [15] und TRAIL [108] ausschütten und sich so gegen Erreger wie auch Immunzellen schützen.

Beide Mechanismen, die Sensibilisierung der Keratinozyten gegen Apoptose wie auch die Expression Apoptose-induzierender und zytotoxischer Moleküle, können durch Apoptose oder Lyse einer der beteiligten Zellen zur Beendigung der Zell-Zell-Interaktionen beitragen.

1.4 Allergisch-ekzematöse Manifestationen an der Haut

1.4.1 Das atopische Ekzem

Das atopische Ekzem gehört neben dem *Asthma bronchiale* und der *Rhinoconjunctivitis allergica* zur Trias der atopischen Erkrankungen. Es wird neben dem allergischen und dem toxischen Kontaktekzem sowie einer Reihe spezieller Ekzem-Formen wie dem seborrhoischen oder mikrobiellen Ekzem in der aktuellen Nomenklatur als eine der drei Hauptsäulen der entzündlichen Hauterkrankungen unter dem Oberbegriff Dermatitis geführt [70]. Das atopische Ekzem stellt eine chronisch-rezidivierende Hauterkrankung dar, die aus komplexen Interaktionen zwischen genetischen Determinanten des Organismus und Umweltfaktoren resultiert. Das klinische Bild ist in der Akutphase von Ekzem-Läsionen mit erythematösen Papeln, Erosionen und Exkoriationen geprägt, während bei der chronischen Form eine verdickte Epidermis mit Zeichen von Lichenifikation dominieren [36]. Das Hauptsymptom des atopischen Ekzems ist ein quälender und die Lebensqualität enorm einschränkender Juckreiz.

Pathogenetisch liegt dem atopischen Ekzem ein Zusammenspiel aus einer Störung der epidermalen Barriere-Funktion mit abnorm reagierenden Keratinozyten und eine Störung des Immunsystems mit einer Beteiligung vor allem von Dendritischen Zellen (DC) und T-Zellen zugrunde (vgl. Abb.1.3-1): In den Keratinozyten von Atopikern wurde ein veränderter Lipid-Metabolismus nachgewiesen, aus dem ein verringerter Gehalt an Ceramiden resultiert. Neben der auf diese Weise gestörten Barrierefunktion, die sich klinisch in Haut-Trockenheit und erhöhter Anfälligkeit gegen Irritantien (und Allergene) aus der Umwelt äußert, wurde eine Erhöhung des Entzündungs-Transkriptionsfaktors AP-1 (activator protein-1) beobachtet; diese erklärt sich durch den Antagonismus von Ceramiden zur PKC (Proteinkinase C), die über den AP-1-Weg Entzündung vermittelt [23,48]. Neben dieser erhöhten Neigung zu Entzündungsreaktionen wurde in Keratinozyten aus akuten Ekzem-Läsionen eine verminderte Synthese des anti-inflammatorisch wirkenden Interleukin-10-Rezeptors festgestellt [96].

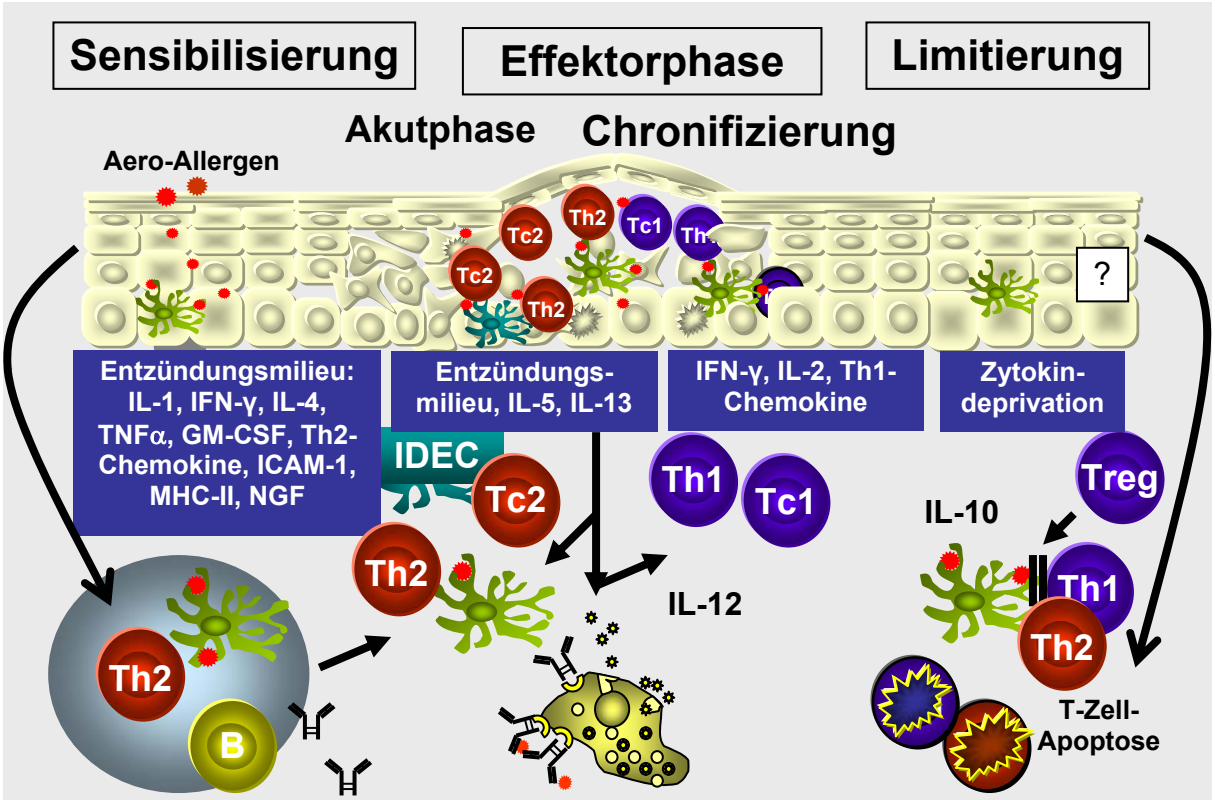


Abb. 1.3-1. Das atopische Ekzem.

Über die Produktion von Chemokinen wie CCL-5 (früher RANTES), [67] und CCL-2 (früher MCP-1) tragen Keratinozyten aus Läsionen des atopischen Ekzems zur

Rekrutierung und Zusammensetzung des aus Th1- und Th2-Zellen bestehenden T-Zell-Infiltrats bei [49].
Die gestörte Hautbarriere von Patienten mit atopischem Ekzem hat eine erleichterte Penetration von Allergenen und damit eine für Entzündungsreaktionen anfällige Haut zur Folge. Parallel zu dieser vermehrten Exposition werden bei den Patienten gehäuft Allergien vom Soforttyp gegen Nahrungsmittel und Aeroallergene beobachtet, die mit einem erhöhten IgE-Spiegel und nicht selten einer Eosinophilie im Blut einhergehen.
Diese Th2-vermittelten Immunparameter werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Monozyten, ortsständigen Langerhans-Zellen (LC) und Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) gesteuert, die bei Patienten mit atopischem Ekzem ebenfalls einige Dysregulationen offenbaren:
APC werden durch die erhöhte Expression von TSLP (Thymus-Stroma Lymphopoeitin) in Keratinozyten von Atopikern aktiviert und beeinflussen die T-Zell-Differenzierung und -Rekrutierung durch Zytokin- und Chemokinproduktion vom Typ2 [124]. TSLP bewirkt darüber hinaus in DC die Expression von IL-12 und damit eine T-Zell-Differenzierung sowohl zu Typ1- als auch Typ2-Zellen [151]. Im Mausmodell konnte kürzlich durch Überexpression von TSLP der Phänotyp eines atopischen Ekzems generiert werden [160].
Eine veränderte FcεRI-vermittelte Signalkaskade in APC von Atopikern gibt weitere Hinweise auf eine Beeinflussung der Immunantwort in Th2-Richtung in der Frühphase des atopischen Ekzems [79].
Ein weiterer intrinsischer Defekt in Monozyten von Patienten mit atopischem Ekzem resultiert aus einem erhöhten Gehalt an dem Enzym cAMP-Phosphodiesterase [60], der zu einer erniedrigten Konzentration an intrazellulärem cAMP führt und mit einer erhöhten PGE_2- (Prostaglandin E2) Konzentration korreliert; auch diese Faktoren sind an der Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 beteiligt.

Nach dem heutigen Konzept kommt es durch das beschriebene Zusammenspiel aus abnorm reagierenden Keratinozyten und APC in Kombination mit Typ I-Allergien und einem entzündungsfreundlichen Milieu zur Infiltration von CLA+ T-Zellen in die Epidermis. Die T-Zell-induzierte Apoptose in Keratinozyten scheint bei der Ekzementstehung ein wichtiger Pathomechanismus zu sein [143]. Ein früher Effekt der T-Zellen auf die Keratinozyten könnte dabei die Zerstörung interzellulärer

Junktionsproteine wie dem E-Cadherin sein, die zu Verlust des Zellverbandes und damit zu Spongiose, einem wichtigen histologischen Kriterium ekzematöser Läsionen, führt [144].
In akuten Ekzem-Läsionen findet sich dabei eine klare Dominanz von Typ 2-Zellen; im Stadium der Chronifizierung jedoch überwiegt eine Typ 1-vermittelte Immunantwort mit hohen Konzentrationen an IFN-γ in den Läsionen [55,153]. Diese Verschiebung in Richtung einer Th1-Antwort wird derzeit durch folgende Hypothese erklärt:
Die Imballance zugunsten einer Th2-Immunantwort hat eine Eosinophilie zur Folge; diese eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen produzieren als Reaktion auf den inflammatorischen Reiz das Zytokin Interleukin-12 (IL-12). IL-12 führt zu einer Aktivierung Allergen-spezifischer und -unspezifischer Th0/Th1-Zellen; deren Produktion von IFN-γ unterdrückt die initiale Th2-Antwort und ist verantwortlich für Chronifizierung und Schweregrad der Läsionen [53].

Zu den wichtigsten Auslösefaktoren von akuten Schüben des atopischen Ekzems zählt Stress. Erste Erfolge auf dem Gebiet der Psychoneuroimmunologie weisen auf metabolische Veränderungen hin, in die Neuro-Transmitter wie Substanz P und NGF (Nerve growth factor) eingebunden sind [138].
Ein weiterer Trigger-Faktor sind die Keime Staphylococcus aureus und Malassezia furfur (früher Pityrosporum ovale), die die Haut von Atopikern regelmäßig besiedeln und in das Entzündungsgeschehen eingebunden sind [69,111].

1.4.2 Die allergische Kontaktdermatitis

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine T-Zell-abhängige allergische Hauterkrankung mit der Kinetik einer verspäteten Immunreaktion (Typ IV nach Coombs und Gell) auf niedermolekulare Stoffe (Haptene), die in zwei Phasen und selbstlimitierend verläuft (vgl. Abb. 1.3-2):
Die sensibilisierenden Haptene können in der ersten Phase der Reaktion, der Sensibilisierungsphase, durch die Haut wandern und durch die Bindung an körpereigene Proteine wie dem Albumin zum Vollantigen werden, wobei die häufigen Kontaktallergene auch eine Dosis-abhängige irritativ-toxische Wirkung aufzeigen

[52]. Epidermale Langerhans-Zellen (LC) und andere MHC-II exprimierende Zellen nehmen das Hapten-modifizierte körpereigene Protein auf, prozessieren es in den Endosomen und präsentieren das Hapten an ihrer Oberfläche. Im Laufe dieses Prozesses kommt es über die Phosphorylierung von Tyrosin-Kinasen [81] zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB [161]. Dieser bewirkt die Produktion proinflammatorischer Botenstoffe wie dem IL-1β [42] und von Chemokinen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen in APC und Endothelzellen. Auch direkte Effekte von Nickel auf MHC-II exprimierende Zellen konnten nachgewiesen werden: so reagierten Keratinozyten auf Nickel-Stimulus mit einer Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD80 [149].
Diese Faktoren ermöglichen die Migration der LC in die regionalen Lymphknoten, wo das Antigen naiven T-Zellen präsentiert wird [115]. Es kommt zur klonalen Expansion und Differenzierung der Allergen-spezifischen T-Zellen.

In der zweiten Phase der Kontaktdermatitis, der Effektorphase, die mit dem klinischen Bild eines akuten Ekzems einhergeht, kommt es bei erneutem Kontakt des Organismus mit dem spezifischen Hapten zu einer effektiven Antigen-Präsentation in den lokalen Lymphknoten und konsekutiv zu einer Migration von CLA+ T-Zellen und APC in Dermis und Epidermis [51].
Die einwandernden T-Zellen sind infolge der Art der Antigen-Präsentation und des Zytokin-Milieus überwiegend vom Typ 1. Sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen bringen die Keratinozyten in Apoptose, wobei die CD8+ Zellen hauptsächlich Effektor-, die CD4+ Zellen sowohl Effektor- als auch Modulatorfunktionen übernehmen [24,47,140]. Im Nickel-spezifischen System konnte gezeigt werden, dass diese Apoptose-Induktion über verschiedene Mechanismen erfolgt: Tc1 und Th1-Klone induzierten Apoptose über Perforin und das Fas/FasL-System, Tc2-Klone nur über Perforin und Th2-Klone über Fas/FasL, letztere allerdings nicht in Keratinozyten, sondern nur in Nickel-beladenen EBV-transformierten B-Zellen [140].
Diese Apoptose in Kombination mit dem proinflammatorischen Milieu verursacht das klinische Bild der akuten Ekzemreaktion mit exsudativ-entzündlichen Hauterscheinungen, das histologisch geprägt ist von einem massiven mononukleären Infiltrat und Keratinozyten-Apoptose mit Verlust des Zellverbandes (Spongiose) und nachfolgendem, interzellulären Ödem [120].

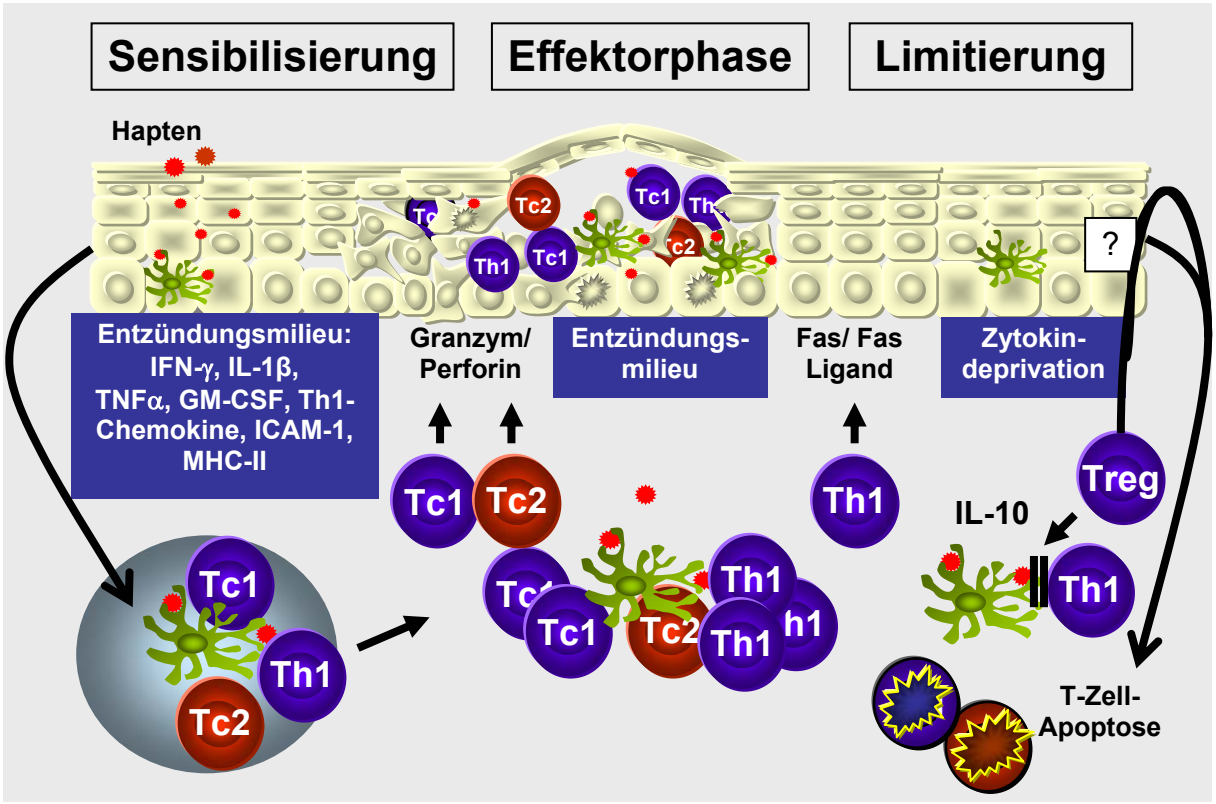


Abb. 1.3-2. Schema der allergischen Kontaktdermatitis.

Die Nickel-Allergie stellt die bei weitem häufigste Überreaktion dieses Typs dar und ist als Berufskrankheit anerkannt. Obwohl die Prävalenz infolge einer Modeschmuck-Verordnung von 1993 seit einigen Jahren rückläufig ist, zählt Nickel weiterhin zu den häufigsten Kontaktallergenen [146]. In dieser EU-weiten Direktive wurde beschlossen, dass Ohrstecker kein Nickel und anderer Modeschmuck noch höchstens 0,5µg/cm² Nickel enthalten dürfen [39].

1.5 Die Limitierung der allergischen Reaktion

Die Limitierung der allergischen Reaktion konnte bisher nicht umfassend aufgeklärt werden. Drei Faktoren könnten nach dem aktuellen Stand der Forschung eine Rolle spielen:

Eine die Immunantwort unterdrückende CD4+ CD25+ Subpopulation, die sogenannten T-regulatorischen Zellen (T-reg, vgl. 1.2.1), verhindert eine effektive Antigenpräsentation und trägt somit zur Beendigung der Immunreaktion bei; die

Bedeutung dieser Zellpopulation wurde sowohl im atopischen Ekzem (vgl. 1.3.1) als auch bei dem allergischen Kontaktekzem auf Nickel (vgl. 1.3.2) nachgewiesen.

Ein zweiter limitierender Faktor scheint die Apoptose von T-Zellen durch die im Verlauf der Reaktion geringer werdende Konzentration proinflammatorischer Zytokine mit konsekutivem Abfall des Apoptose-inhibierenden Moleküls Bcl-2, also eine Zytokindeprivation, zu sein [103].

Bislang beschreibt eine Arbeit eine mögliche Rolle von Keratinozyten in der Beendigung einer Ekzemreaktion: so konnte in aktivierten Keratinozyten eine gesteigerte Expression von FasL nachgewiesen werden, die durch IL-10 antagonisierbar war und in der T-Zell-Linie „Jurkat“, die den Fas-Rezeptor konstitutiv exprimiert, Apoptose induzieren konnte [8]. Der Hauptkritikpunkt an dieser Arbeit ist die Tatsache, dass sie von der *in vivo*- Situation durch Verwendung einer T-Zell-Linie und heterologer Keratinozyten sehr weit entfernt ist.
Darüber hinaus wurde die Expression der antibakteriellen (aber auch zytotoxischen) Moleküle Granzym B und Perforin [15] und an anderer Stelle die Induktion der Apoptose-induzierenden TRAIL-Moleküle [108] in aktivierten Keratinozyten nachgewiesen.
Keratinozyten verfügen also zumindest über ein Arsenal an Apoptose-induzierenden Molekülen, das sie gegen fremde Zellen wie auch körpereigene Immunzellen schützen könnte.

2 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit soll die immunologischen Vorgänge während der Effektorphase der allergischen Hautreaktion und damit die Mechanismen der Ekzementstehung, -chronifizierung und -limitierung beleuchten.

Im Zentrum der Arbeit stehen zwei Fragen:

A Welche Zellen des Immunsystems sind an der Ekzementstehung *in vivo* beteiligt, wie verhalten sie sich morphologisch und in welchem zeitlichen Ablauf findet eine solche Reaktion statt?

B Wie interagieren die beiden hauptsächlich beteiligten Zelltypen – T-Zellen und Keratinozyten – *in vitro* miteinander?

A Das atopische Ekzem und die allergische Kontaktdermatitis sind häufige dermatologische Erkrankungen, die sich klinisch sehr ähneln, denen aber unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen. Durch Patch Test-Verfahren lassen sich in sensibilisierten Individuen akute Ekzemreaktionen auslösen (Atopie Patch Test beispielsweise gegen Pollen bei einer Subgruppe von Patienten mit AE, Epikutantest gegen Nickel bei Kontaktallergikern).
Aus solchen induzierten Ekzemreaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Allergen-Provokation entnommene Biopsien sollen in dieser Arbeit histologisch und immunhistochemisch untersucht werden, um Rückschlüsse auf die abgelaufene Immunreaktion und die Vergleichbarkeit beider Immunantworten ziehen zu können.

B Ziel des zweiten Teils der Arbeit ist die Etablierung eines vereinfachten humanen spezifischen autologen Ekzem-Modells, das die allergische Kontakt-Dermatitis auf Nickel *in vitro* imitiert und anhand dessen die Interaktionen zwischen T-Zellen und Keratinozyten im akuten Ekzem studiert werden können.
Dazu sollen zunächst Allergen-spezifische T-Zell-Klone aus dem peripheren Blut sensibilisierter Individuen isoliert und etabliert werden. Aus iatrogen induzierten Hautblasen der gleichen Patienten sollen primäre Keratinozyten kultiviert werden. In An- und Abwesenheit autologer Antigen-präsentierender Zellen können die T-Zell-Klone dann mit den Keratinozyten kokultiviert werden.
Als Endpunkte in diesen Koinkubationen werden die Einflüsse von Keratinozyten auf die Proliferationsaktivität der T-Zell-Klone sowie auf deren Produktion von Zytokinen auf ihr spezifisches Antigen hin gewählt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Probanden

Für einen morphologischen Vergleich des Nickel- und des Pollen-induzierten Ekzems wurden drei Patientengruppen für die Studie ausgewählt:

Gruppe I: Pollenallergiker
Dieses Kollektiv bestand aus vier Patienten mit Atopischem Ekzem (AE) und einer Typ I-Sensibilisierung gegen Gras- (Phleum pratense) oder Birken- (Betula alba) Pollen. Spezifisches IgE gegen Gras- oder Birkenpollen im Serum dieser Patienten wurde mit dem Pharmacia CAP System FEIA (Pharmacia, Uppsala, Schweden) quantifiziert (vgl. Tab. 3.1-1).
Die Patienten gaben anamnestisch eine Verschlechterung ihres Ekzems während der Pollensaison an.
Ein nach den Richtlinien der „European taskforce on atopic dermatitis“ [37] mit nativen Pollen durchgeführter und abgelesener Atopie Patch Test (APT) war bei diesen Patienten bei mindestens einer der oben genannten Pollenspezies positiv.

Gruppe II: Nickelallergiker
Diese Gruppe setzte sich aus drei Patienten mit einer Nickelallergie zusammen.
Die Patienten gaben anamnestisch an, dass sie ein lokales Ekzem entwickeln, wenn sie Modeschmuck oder bestimmte Gürtelschnallen tragen.
Ein Nickel-Epikutantest war bei diesen Patienten positiv (vgl. Tab. 3.1-1).

Gruppe III: Kontrollgruppe
In diese Kategorie waren einerseits Probanden eingebunden, bei denen sich weder anamnestisch Symptome einer Allergie gegen Pollen oder Nickel erheben, noch spezifisches IgE gegen Gras- oder Birkenpollen im Serum nachweisen ließen und die nicht unter AE litten.
Der APT auf Gras- und Birkenpollen war bei diesen Probanden negativ.

Andererseits gehörten Patienten mit AE und einer anamnestisch erhobenen und durch Nachweis von spezifischem IgE im Serum bestätigten Typ I-Allergie gegen Gräser- oder Birkenpollen dieser Gruppe an, bei denen der APT negativ war.
Einem weiteren Patienten mit AE ohne Sensibilisierungen gegen Pollen wurden Biopsien aus chronischen Hautläsionen entnommen, um eine Vergleichbarkeit zum Bild der akuten Ekzemreaktion des APT herzustellen.

An der *in vitro*-Untersuchung der Mechanismen der Ekzemreaktion nahmen zwei Patienten mit einer Nickelallergie teil (vgl. Tab. 3.1-1). Die Ein- und Ausschluss-Kritierien entsprachen dabei denen des immunhistochemischen Teils.

Patient	**Gruppe**	**Alter**	♀/♂	**Allergie**	**Atopie**			**NPT**
					Totale/ spez. IgE-AK (Klasse) in kU/ml	AE	APT	
KE	Gruppe I	24	♂	Phleum, Betula	893/ Phl. 80,2 (5)/ Bet. 11,6 (3)	Ja	+++	-
WG	Gruppe I	32	♂	Phleum	89,8/ Phl. >100 (6)/ Bet. 0,1 (0)	Ja	+++	-
MP	Gruppe I	20	♂	Betula	197/ Phl. 14,8 (3)/ Bet. 91,8 (5)	Ja	++++	-
JS	Gruppe I	36	♂	Phleum, Betula	3775/ Phl. 8,0 (3)/ Bet.>100 (6)	Ja	++	-
SH	*in vitro*	29	♀	Nickel	17,6/ Phl.>0,35 (0)/Bet.>0,35 (0)	Nein	-	++++
ID	Gruppe II *in vitro*	43	♀	Nickel	35/ Phl.>0,35 (0)/ Bet.>0,35 (0)	Nein	-	+++
IN	Gruppe II		♀	Nickel	Nicht getestet	Nein	-	+++
JH	Gruppe II	56	♀	Nickel	62,2/ Phl.>0,35 (0)/Bet.>0,35 (0)	Nein	-	+++
GG	Gruppe III	25	♀	Keine	6,74/ Phl.<0,35 (0)/Bet.<0,35 (0)	Ja	-	-
BD	Gruppe III	24	♀	Keine	>2/ Phl.>0,35 (0)/Bet.>0,35 (0)	Nein	-	-
CG	Gruppe III	24	♂	Keine	17,8/ Phl.>0,35 (0)/Bet.>0,35 (0)	Nein	-	-
TE	Gruppe III			Keine	Nicht getestet	Nein	-	-
AL	Gruppe III	35	♀	Phleum, Betula	Nicht getestet	Ja	-	-
SW	Gruppe III		♀	Keine	Nicht getestet	Ja	-	-

Tab. 3.1-1. Charakterisierung der Probanden.

3.1.2 Biologisches Material

Pollen:

Betula alba *L*. (Birkenpollen)	Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0125
Phleum pratense *L*. (Lieschgraspollen)	Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0113
Albumin, bovine (BSA)	Sigma, München Best.-Nr. A-8806
Fetal bovine serum (FBS), Charge CNH0003 (T-Zellen) Charge AJE10327 (Feedermedium)	Perbio, Bonn Best.-Nr. CH30160.03 Best.-Nr. SH30066
Humanes AB Serum	Sigma, München Best.-Nr. H-4522

3.1.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Chemikalien

2-Mercapto-Ethanol	Sigma, München Best.-Nr. M-7522
Adenin	Sigma, München Best.-Nr. A-9795
Antibiotic-Antimycotic Solution	PAA, Linz, Österreich Best.-Nr. P 11-002
Antikörperverdünnungsmedium	Dako, Hamburg Best.-Nr. S-2022
Aqua ad injectabilia	Delta-Select, Pfullingen Bezug über Apotheke
Buffer Kit (Immunhistochemie)	Dako Chem Mate, Hamburg Best.-Nr. K-5006
CFSE	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

	Best.-Nr. C-1157
Choleratoxin	Sigma, München
	Best.-Nr. C-3012
Detection Kit (Immunhistochemie)	Dako Chem Mate, Hamburg
	Best.-Nr. K-5005
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Baker, Griesheim
	Best.-Nr. 7157
DMEM	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 41966-029
DPBS Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 14040174
DPBS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 14190094
EDTA	Sigma, München
	Best.-Nr. ED4SS
EDTA 0,5M	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 15575-020
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma, München
	Best.-Nr. E-4127
Einbettmedium Immunhistochemie	Leica Instruments, Wetzlar
	Best.-Nr. 0201 08926
Gelatine	Merck (VWR), Darmstadt
	Best.-Nr. 1040780500
Gentamycin	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 15710049
Glucose	Sigma, München
	Best.-Nr. G-7528
GM-CSF	Immunotools, Friesoythe
	Best.-Nr. 11133125
HAM´s F12	Sigma, München
	Best.-Nr. N-6760
HBSS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 24020091
Heparin-Natrium 250.000U	Ratiopharm, Ulm

	Best.-Nr. PZN-7833909
Humanes rekombinantes IFN-γ	R&D, Wiesbaden
	Best.-Nr. 285-IF
Hydrocortison	Sigma, München
	Best.-Nr. H-0135
Insulin	Sigma, München
	Best.-Nr. I-1882
Keratinozyten Basalmedium + Supplemente	Promocell, Wien, Österreich
	Best.-Nr. C-20211
L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 25030024
Lymphoprep	Progen Biotechnik, Heidelberg
	Best.-Nr. 111-4545
Mitomycin C	Sigma, München
	Best.-Nr. M-4287
Na-Pyruvat	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 11360-039
Nickelsulfat	Sigma, München
	Best.-Nr. N-4882
Non-essential Amino Acids	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 11140-35
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 15140130
PHA (Lectin)	Sigma, München
	Best.-Nr. L-9132
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma, München
	Best.-Nr. P-8920
RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 31870-025
Super sensitive detection kit (Immunhistochemie)	Bio Genex, CA, USA
	Best.-Nr. QAOOO-5L
Transferrin	Sigma, München
	Best.-Nr. T-5391
Trizma Base (Immunhistochemie)	Sigma, München

	Best.-Nr. T-1503
Trypan Blue 0,4% solution	Sigma, München
	Best.-Nr. T-8154
Trypsin 0,05% EDTA	Invitrogen, Paisley, Schottland
	Best.-Nr. 2530054

Verbrauchsmaterial

96-well Mikrotiterplatten T-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
	Best.-Nr. 167008
96-well Mikrotiterplatten U-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
	Best.-Nr. 163320
96-well Mikrotiterplatten für ELISA (flachbödig)	MaxiSorp, Nunc,
	Roskilde, Dänemark
	Best.-Nr. 449824
Clustertubes 1,2ml	Abgene, Surrey, UK
	Best.-Nr. AB-0672
Cryoröhrchen 1,8ml Außengewinde	Nunc, Roskilde, Dänemark
	Best.-Nr. 375418
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
	Best.-Nr. 02/1066.001
Ektachrome 160T Farbdiafilm	Kodak, UK
	Best.-Nr. 9169504
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
	Best.-Nr. 0030 015.002
Fadenschere Aesculap	Braun Melsungen, Melsungen
	Best.-Nr. BC107R
Falcon Polypropylen-Röhrchen	Becton Dickinson, NJ, USA
15 ml/50 ml	Best.-Nr. 352070 / 2096
Heat sealing paper (β-Counter)	Perkin Elmer, Rodgau-
	Jügesheim
	Best.-Nr. 1450-467
Kapillarspalt-Objektträger 100µm	Dako, Hamburg
	Best.-Nr. S2025
LS-Säulen (MACS)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

	Best.-Nr. 130-041-306
Mikroschraubröhre 2ml PP steril	Sarstedt, Nümbrecht
	Best.-Nr. 72.694.006
Melti Lex TMA (β-Counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
	Best.-Nr. 1450-441
Printed Filtermat A (β-Counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
	Best.-Nr. 1450-421
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
	Best.-Nr. 02.1063.500
Sterilfiltereinheiten 250ml	Nalgene
	Best.-Nr. 1680020
Sterilfiltereinheiten 500ml	Nalgene
	Best.-Nr. 1690020
Sterilfiltereinheiten 500ml	Millipore
	Best.-Nr. FCGVUO5RE

Geräte

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen
Homogenisator	Ultra Turrax T 25 basic, IKA Werke, Staufen
Horizon-Färbeautomat für Immunhistochemie	Dako, Hamburg
Kamera	WILD MPS 52, Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop	Aristoplan, Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Titramax 100,

	Heidolph, Schwabach
Waage	MC1Labor, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 1003, GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge 13, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

3.1.4 Verwendete Medien

3T3-Medium

DMEM, 10% FCS (30min bei 56° C Wasserbad inaktiviert), 5ml Pen/Strep.

Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 10 Tagen

Antibiotika-Antimykotika-Lösungen für Keratinozyten

Lösung I: 500ml DMEM, 15ml Gentamycin, 20ml *Antibiotic-Antimycoticsolution*

Lösung II: 250ml Lösung I + 250ml DMEM

Lösung III: 250ml MEM + 2,5ml *Antibiotic-Antimycoticsolution*

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

Bei Atopikerbiopsien zusätzlicher Gebrauch von 1% Flucloxacillinlösung

Feeder-/ Keratinozytenmedium

300ml DMEM, 150ml HAM´s F12, 10ml Glutamin, 50ml Hyclone II, 5ml Pen/Strep., 1ml Adenin (= 1g), 1ml Hydrocortison (= 1g), 0,5ml Trijodthyronin (= 1mg), 0,5ml Choleratoxin (= 1mg), 0,5ml EGF (Epidermal Growth Factor; = 0,1mg), 0,5ml Insulin (= 100mg), 0,5ml Transferrin (= 10mg)

Sterilfiltiriert, Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 14 Tagen

Mitomycin-Lösung

Mitomycin C 2mg

Stock-Lösung (500µg/ml): mit 4ml DPBS (+Ca^{2+}/Mg^{2+}) direkt in der Flasche lösen.

Lagerung bei 4° C lichtgeschützt

Gebrauchslösung: 2% in RPMI 1640 Medium verdünnt, sterilfiltriert

MACS-Puffer

500ml DPBS Dulbecco´s w/o Ca/Mg, w/o Sodium bicarbonate, 2ml EDTA (entspricht 2mM, aus Invitrogen 0,5M EDTA, pH 8,0), 2,5g BSA (entspricht 0,5%)

Sterilfiltriert, vor Gebrauch entgast (Inkubation im Schüttler für 15min)

Proliferationsmedium (RPMI-Medium complete 5% humanes Serum)

450ml RPMI 1640 Medium with L-Glutamin (Gibco™, Lot No. 3063498), 28ml humanes Serum, 5ml L-Glutamin, 5,6ml Nonessential Aminoacids, 5,6ml Na-Pyruvat, 500µl 50mM 2-Mercaptoethanol

Sterilfiltriert, Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen

EBV-Medium

Ansatz RPMI compl., 50ml FCS (=10%)

Kloniermedium

Ansatz RPMI compl. (s.u.), 25ml Humanes Serum (= 5%), 50ml FCS (30min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert) (= 10%), 5ml *Antibiotic-Antimycotic-Solution*

Sterilfiltriert, Lagerung bei 4-8°C, Verbrauch innerhalb von 7 Tagen

Tris-Puffer (Immunhistochemie)

60,5g Trizma-Base in 700ml Aqua dest. gelöst, mit 2N HCl auf pH 7,6 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt, Lösung von 90g NaCl

Stammlösung: Lagerung bei Raumtemperatur,

Gebrauchslösung (1:10 in Aqua dest. verdünnt): Lagerung bei 4°C

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemie

3.2.1.1 Allergen-Provokation

Die Patienten aus Gruppe I und Gruppe III wurden mit nativem Pollen auf nicht vorbehandelter, klinisch unauffälliger Haut des Rückens für 48 Stunden exponiert. Dazu wurden die Pollen mit Vaseline vermengt und in großen Finn-Kammern mit hypoallergenem Pflaster auf den Rücken aufgebracht. Die Ablesung des APT erfolgte nach 48, 72 und 96 Stunden (bei 6- und 24 Stunden-Biopsien entsprechend früher) nach den Kriterien der „European taskforce on atopic dermatitis“ [37].
Die Nickelallergiker (Gruppe II) wurden mit einem kommerziell erhältlichen Vaselinepräparat, das 5% Nickel(II)-Sulfat enthält, provoziert. Auch der Nickel-Epikutantest wurde nach 48 und 72 Stunden ausgewertet.

3.2.1.2 Gewinnung und Aufbereitung der Biopsien

6, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Allergenprovokation wurden die Probanden im Testgebiet durch subkutane Unterspritzung von 1% Lidocain lokal anästhesiert und anschließend Biopsie-Stanzen von 4 bis 6mm Durchmesser entnommen, die sofort bei -70°C eingefroren wurden.
Vor dem Schneiden wurde das Gewebe in Einbettmedium im Kryostat auf -25°C gekühlt. Die 4µm dünnen Schnitte wurden auf silanisierte, mit Poly-L-Lysin bestrichene Objektträger aufgenommen und bei Raumtemperatur ein bis zwei Stunden getrocknet. Abschließend wurden die Präparate für 10 Minuten in Aceton fixiert und entweder sofort gefärbt oder wieder bei -70°C eingefroren.

3.2.1.3 Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde für die meisten Antikörper mit dem „Tech Mate Horizon“ Färbeautomat der Firma Dako durchgeführt, wobei die primären Antikörper (vgl. Tab. 3.2-1) eine Stunde inkubierten. Verwendet wurden die zugehörigen Lösungen (Antikörperverdünnungsmedium, Puffer) und zur Visualisierung der Reaktion der alkalischen Phosphatase ein Nachweiskit. Abschließend wurden die Schnitte in Gelatine eingebettet.

Antikörper	Isotyp	Klon	Verd.	Firma	BestNr	Spezifität
CD1a	IgG2aκ	NA1/34	1:50	Dako	M-0721	DC (LC)
CD3		polyklonal	vorverd	Dako	N-1580	T-Zellen
CD4		EDU-2	1:50	NovoCastra, Dossenheim	NCL-CD4	T-Zellen/ LC
CD8	IgG1κ	C8/144B	vorverd	Dako	N-1592	T-Zellen
CD25	IgG1κ	ACT-1	1:100	Dako	M-0731	aktivierte/ regulatorische T-Zellen
CD45RO	IgG2aκ	UCHL-1	vorverd	Dako	N-1520	Gedächtnis-T-Zellen
IFN-γ	IgG1κ	45.15	1:50	Alexis, Grünberg	397-020	Th1-Zellen/ Entzündung
IL-5	IgG1	9906.1	1:300	R&D, Minneapolis, USA	MAB-605	Th2-Zellen/ Eosinophile
IgE	IgG1κ	CIA-E-7.12	1:300	Dako	M-7071	Lösliches IgE/ Mastzellen
CD64	IgG1κ	10.1	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg	555525	Monozyten
CD68	IgG2bκ	Y1/82A	1:200	BD Pharmingen	556059	Makrophagen
FcεRI		polyklonal	1:500	Mit freundl. Gen. von PD Dr. A. Wollenberg, LMU München		LC/ IDEC
CD1b		polyklonal	1:100			IDEC
BDCA-2	IgG1	AC144	1:5	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	130-090-691	pDC

Tab. 3.2-1. Primärantikörper.

Der immunhistochemische Nachweis der Zytokine erfolgte manuell: die Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur mit 3% para-Formaldehyd für 20 Minuten fixiert, anschließend für 10 Minuten in Tris-Puffer gewaschen und weitere 30 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer 1% BSA inkubiert. Auf die so vorbehandelten Präparate wurde der verdünnte Primärantikörper (vgl. Tab. 3.2-1) pipettiert und für 60 Minuten belassen. Nach einem weiteren Waschgang inkubierte der biotinylierte Brückenantikörper für 25 Minuten, ehe sich erneut ein 10minütiger Waschschritt anschloß. Darauf wurde Alkalische Phosphatase auf den Objektträger pipettiert und konnte ebenfalls 25 Minuten reagieren. Es folgten ein weiterer Waschgang und die Visualisierung der enzymatischen Reaktion mittels eines Nachweiskits (Bio Genex), wobei dem fertigen Chromogen 1 Tropfen Levamisol/ml zugegeben wurde, um die Reaktion zu inhibieren. Auf einen abschließenden 10minütigen Waschschritt folgte eine leichte Gegenfärbung mit Hämalaun für 3 Minuten. Die Schnitte wurden in einer Küvette unter fließendes Wasser gehalten und noch feucht mit Glyceringelatine eingedeckt.

3.2.1.4 Quantifizierung und statistische Analyse

Zur Beurteilung der Schnitte wurde neben der visuellen Abschätzung des mononukleären Infiltrates eine Quantifizierung unter Zuhilfenahme des Software-Programms „KS 300“ der Firma Zeiss herangezogen. Dieses Programm arbeitet mit unterschiedlichen Farbintensitäten: ab bestimmten Schwellenwerten der Farben Rot, Grün und Blau erkennt es eine Fläche als positiv an. Diese Flächen werden in einem Binärbild weiß dargestellt, während die Farbintensitäten unter dem Schwellenwert schwarz bleiben (vgl. Abb. 3.2-1). Das Programm rechnet die absolute Fläche in µm sowie die relative Fläche in % zur Gesamtfläche aus.
Den Schwellenwert, ab dem ein Punkt als positiv angesehen wird, kann der Untersucher manuell festlegen. Deshalb wurde die Auswertung einfach verblindet durchgeführt, so dass der Untersucher nicht wusste, welches Präparat er auswertete.

Im Falle des Markers für pDC, BDCA-2, wurden die positiven Zellen einer über dieselbe Software ausgemessenen Fläche gezählt und auf einen mm² umgerechnet.

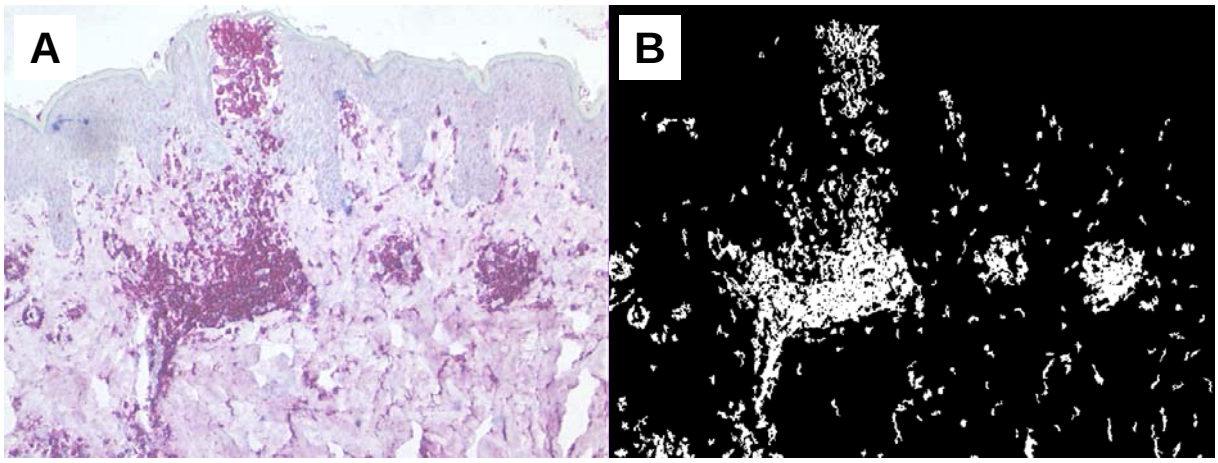


Abb. 3.2-1. Quantifizierung der Antikörper-Bindung bei Immunhistochemien mittels Software (KS 300, Firma Zeiss). A: Original-Bild, B: Binär-Bild.

Erhaltene Datenpaare wurden mittels eines zweiseitigen T-Tests auf signifikante Unterschiede getestet, wobei ein P-Wert <0,05 als statistisch signifikant gewertet wurde.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Generierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone

Allergenspezifische T-Zell-Klone wurden aus peripherem Blut in drei Schritten isoliert: zunächst wurde eine T-Zell-Linie mit dem Allergen stimuliert, geklont und schließlich die Klone auf ihre Spezifität hin untersucht und charakterisiert (vgl. Abb. 3.2-1).

Schritt 1: Etablierung einer T-Zell-Linie, Stimulation mit Allergen (Tag 1-7)
Um T-Zellen zu kultivieren und die allergenspezifischen T-Zellen anzureichern, wurde den Probanden 50ml Vollblut aus der Armvene in EDTA-Monovetten oder in heparinisierte 50ml-Spritzen entnommen.
Das Blut wurde in DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} auf 100ml verdünnt, je 25ml wurden in einem 50ml Falcon-Röhrchen auf 20ml Lymphoprep Trennmedium vorsichtig überschichtet. Nach 45minütiger Zentrifugation bei 470xg ohne Bremse bildeten sich nach ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennte Banden: oben das verdünnte Patientenplasma, dann eine Schicht mit PBMC (periphere blood mononuclear cells, also Monozyten, NK-Zellen, T- und B-Zellen) und Thrombozyten direkt oberhalb des

Trennmediums und im Konus die restliche Zellmasse. Die PBMC wurden vorsichtig aspiriert und zweimal mit DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen (beim ersten Mal Zentrifugation mit 409xg für 20 Minuten, beim zweiten Waschgang 301xg für 10 Minuten).

Ein Aliquot (10µl) der PBMC wurde in 90µl 0,5% Trypan-Blau aufgenommen, 10µl dieser Suspension wurden in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen aller vitalen Zellen in den vier Eckquadraten quantifiziert. Die PBMC wurden daraufhin mit Proliferationsmedium auf eine Konzentration von $10x10^6$/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde 1ml für die Infektion von B-Zellen mit EBV (Ebstein-Barr-Virus, HHV-4) abgenommen (vgl. *Infektion von B-Zellen mit EB-Virus*).

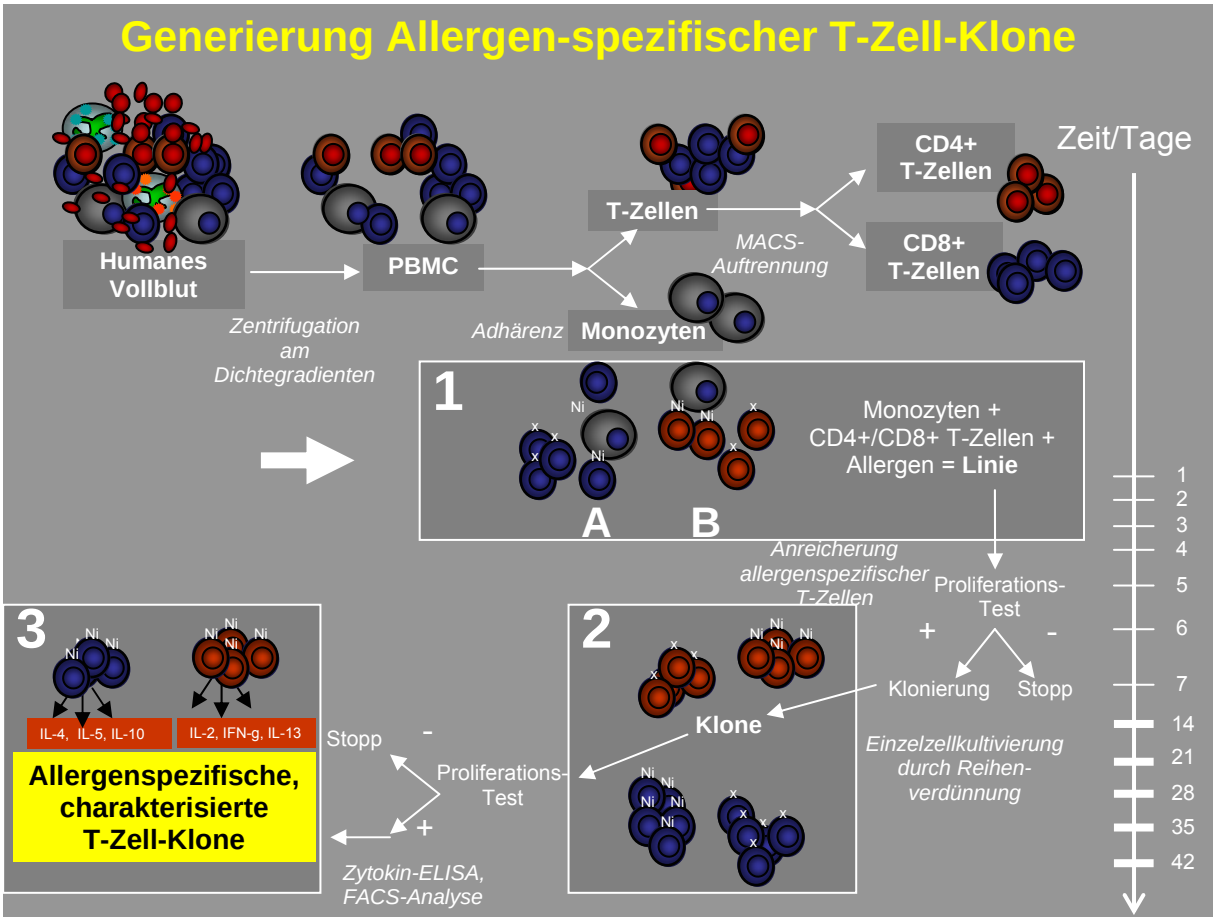


Abb. 3.2-1. Generierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone; Anlegen einer T-Zell-Linie (1), Klonierung (2), Charakterisierung der T-Zell-Klone (3).

Die verbleibenden PBMC wurden in einer Konzentration von ca. $6x10^6$/ml zu je 6ml in einer Petrischale im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 für 2 Stunden inkubiert. In dieser Zeit adhärierten die Monozyten, während die T- und B-Zellen in Suspension

blieben. So konnten durch vorsichtiges Asservieren des Mediums und dreimaliges Waschen mit Vollmedium nicht adhärente PBMC von Monozyten getrennt werden.
Die adhärierenden Monozyten wurden für 30 Minuten im Inkubator mit DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} 2mM EDTA vorgelöst und schließlich mechanisch mittels eines Zellschabers in Suspension gebracht, gezählt und in Proliferationsmedium auf eine Konzentration von $8x10^5$/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden je 100µl in eine Vertiefung einer 96well-Mikrotitertplatte (MTP) pipettiert. Die Monozyten dienten als Antigen-präsentierende Zellen (APC).
Zu den Monozyten wurde das Allergen pipettiert: aus einer 10mg/ml konzentrierten Lagerungs-Lösung ($NiSO_4$ in Aqua dest. verdünnt) wurde mit DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} eine 200µg/ml Gebrauchslösung hergestellt. Von dieser wurden 20µl/well zugegeben, was bei einem Gesamtvolumen von 200µl/Vertiefung eine Endkonzentration von 20µg/ml ergab.
Als Positiv-Kontrolle diente ein Lectin (PHA, Phythämagglutinin), den Negativkontrollen wurde 20µl Vollmedium zupipettiert.
Aus den in Suspension befindlichen T- und B-Zellen wurden mit magnetischen Antikörpern (MACS-System) durch zwei Positiv-Selektionen CD4+ und CD8+ T-Zellen isoliert. Dafür wurden die nicht-adhärenten Zellen zunächst gezählt und zentrifugiert. Per 10^7 Zellen wurde das Pellet in 80µl entgasten MACS-Puffer und 20µl CD8 *beads*-Suspension aufgenommen und für 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert.
Anschließend wurden Säulen, die durch einen Magneten laufen, mit 6ml MACS-Suspension kalibriert und die Zell-Antikörper-Suspension aufpipettiert. Die an die magnetischen Antikörper gebundenen Zellen blieben auf Höhe des Magneten in der Säule hängen, während die Negativ-Selektion aufgefangen wurde. Aus der Säule wurden die Zellen in Abwesenheit des Magneten mechanisch in ein anderes Gefäß gedrückt, gezählt und in Vollmedium auf eine Konzentration von 10^6/ml gebracht.
Für die Negativselektion wurde der Schritt unter Verwendung von CD4 Antikörper-beads wiederholt. Auch die CD4+ T-Zellen wurden auf 10^6/ml eingestellt.
In jede MTP-Vertiefung wurden 100µl (entsprechend $10x10^5$ Zellen) CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen pipettiert.

Die so entstandene T-Zell-Linie wurde für 7 Tage bei 37° C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Monozyten den T-Zellen das Allergen präsentieren, was eine klonale Expansion der Allergen-spezifischen T-Zellen zur Folge hatte. Der Ablauf dieser

Immunreaktion und damit das Vorhandensein Allergen-spezifischer T-Zellen in der generierten Linie wurden nach 5 Tagen mit einer parallel angesetzten T-Zell-Linie nachgewiesen. Dabei fand der H^3-Thymidin-Test Anwendung.

H^3-Thymidin-Test

Dieser Proliferationstest beruht auf der Messung der Mitoseaktivität durch den indirekten Parameter der DNA-Synthese. Radioaktiv markiertes Thymidin tritt in Kompetition mit dem unmarkiertem Nukleotid und wird in neu synthetisierte DNA eingebaut, wobei es nicht zum Kettenabbruch kommt. Anschließend wird die Radioaktivität und damit der Grad der Aufnahme des Thymidins in die Zellen mittels eines β-Counters gemessen.

Hierzu wird den mit den Testsubstanzen stimulierten Zellen nach fünf Tagen 10µg/ml H^3-Thymidin zugegeben; nach einer 6stündigen Inkubationszeit, in denen in neu synthetisierte DNA das Thymidin eingebaut wird, werden die Zellen vom radioaktiven Überstand getrennt, indem die Suspension mittels eines Vakuums durch einen Filter gesogen wird, in dem die Zellen hängen bleiben. Dieser Filter wird getrocknet und anschließend mit einem Festszintillator verschmolzen. Der Szintillator macht die Radioaktivität für den β-Counter lesbar. Es folgt die Auswertung, wobei die „counts per minute“ (cpm) direkt mit der Menge an neu gebildeter DNA und damit der Proliferationsaktivität korrelieren.

Infektion von B-Zellen mit EB-Virus

Da die Isolierung von Monozyten relativ aufwendig ist und größere Mengen Blutes erfordert, wurden autologe B-Zellen mit dem Ebstein-Barr-Virus (HHV-4) infiziert, um sie dauerhaft in Kultur halten zu können. Das virulente Virus erhöht unter anderem durch Kodierung für das proliferationsfördernde und Apoptose unterdrückende Protein LMP-1 (latent membrane protein 1), [4] die Vitalität der Wirtszellen und wirkt so immortalisierend. Die B-Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Allergen-Präsentation nicht.

$10x10^6$ PBMC wurden in EBV-Medium aufgenommen und 1ml Überstand einer EBV-infizierten Zell-Linie, zwei weitere ml EBV-Medium sowie 2,5µg/ml Ciclosporin A (zur Unterdrückung des T-Zell-Wachstums) in ein 50ml PP-Röhrchen zugegeben und über Nacht im Inkubator gelagert. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen mit DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} aufgefüllt, bei 301xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das

Pellet in 6ml EBV-Medium aufgenommen. Je 2ml wurden in eine Vertiefung einer 24-kämmerigen MTP gegeben. Alle zwei bis drei Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt; hatten die Zellen die Kammern komplett ausgefüllt, wurden sie geteilt, bis alle 24 Vertiefungen der Platte gefüllt waren. Dann wurden die Zellen in Zell-Kulturflaschen weiter kultiviert, bis sie entweder gebraucht oder eingefroren wurden.

Schritt 2: Klonierung, Expansion der Klone (Tag 7-21)

Eine Woche nach Ansetzen der T-Zell-Linie wurde bei erfolgreichem Nachweis einer Proliferation auf Allergenprovokation hin die Linie durch Reihenverdünnung auf eine Konzentration gebracht, die einem statistischen Wert von 0,6 bzw. 0,8 Zellen/ Plattenvertiefung entspricht, so dass sich bei gleichmäßiger Aussaat der Zellen in sechs bzw. acht von zehn Vertiefungen eine Zelle befinden müsste. Diese Verdünnung hat zum Ziel, aus einer einzigen Mutterzelle durch klonale Expansion Tochterzellen der gleichen genetischen Information und damit einen T-Zell-Klon zu generieren.

Dazu wurden zunächst heterologe PBMC zwei Stunden im Inkubator mit einer 4%igen Mitomycin C-Lösung behandelt. Dieses Spindelgift verhindert die Polymerisierung von Aktinfilamenten und damit die Trennung der autologen Chromosomenpaare während der Metaphase der Mitose. Die Zellen sind also teilungsunfähig, bleiben aber zunächst in der Lage, untereinander zu kommunizieren. Die aus frisch isoliertem EDTA-Vollblut gewonnenen PBMC wurden nach der Isolierung und der Inkubation dreimal vorsichtig mit PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen, wobei der Überstand gesondert entsorgt wurde, anschließend gezählt und in Kloniermedium auf eine Konzentration von $3{,}5x10^6$ Zellen/ml eingestellt.
Der Suspension wurden 2% PHA (Phythämagglutinin, in der Konzentration von 1g/ml) zugegeben. $3{,}5x10^5$ Zellen wurden in jede Kammer einer rundbödigen MTP mit 96 Vertiefungen suspendiert.
Die Zellen dienten dazu, eine natürliche Umgebung für die eine T-Zelle der angelegten Linie zu schaffen, die in einem zweiten Schritt in statistisch sechs bzw. acht von zehn dieser Vertiefungen suspendiert wurde:

Je nach Zellzahl wurden drei bis vier Vertiefungen der an Tag eins angelegten, durch Allergenzugabe mit den für das gewünschte Allergen spezifischen T-Zellen

angereicherten T-Zell-Linie suspendiert und in einer Reihenverdünnung mit RPMI Medium jeweils 1:2 verdünnt und mittels Nativ-Färbung so lange gezählt, bis die absolute Zellzahl im entnommenen Aliquot noch mindestens acht Zellen betrug.
Acht gezählte Zellen in den vier Eckquadraten entsprachen beispielsweise:

$$8x2{,}5x10^3 = 3x10^4 \text{ Zellen/ml der Suspension}$$

Diese Zellsuspension wurde anschließend in zwei Schritten je 1:10 verdünnt, so dass sich im obigen Beispiel eine Endkonzentration von 300 Zellen/ml ergeben hätte. Die angestrebte absolute Zellzahl betrug 180 Zellen (0,6 Zellen/Vertiefung bei 30ml Gesamtvolumen) bzw. 240 Zellen (0,8 Zellen/Vertiefung bei 30ml Gesamtvolumen). Im Beispiel also wären von der Suspension mit der größten Verdünnung 800µl bei einer gewünschten Endkonzentration von 0,8 Zellen/Vertiefung entnommen und in 29,2ml Kloniermedium resuspendiert worden. Den 30ml Kloniermedium wurden dabei 180µl IL-2 (in einer Konzentration von $10x10^3$U/ml, entspricht final 30U/ml) zugegeben.

Die so maximal stimulierten, in teilungsunfähige „Fütterzellen“ eingebetteten einzelnen vitalen T-Zellen wurden für sieben Tage bei 37° C inkubiert.
Ab dem 14. Tag nach Anlegen der Linie wurden in einigen der Plattenvertiefungen wasserklare, birnenförmig auslaufende vitale Zellen sichtbar, die sich zu einem makroskopisch erkennbaren T-Zell-Klon vermehrten (vgl. Abb. 3.2-2).

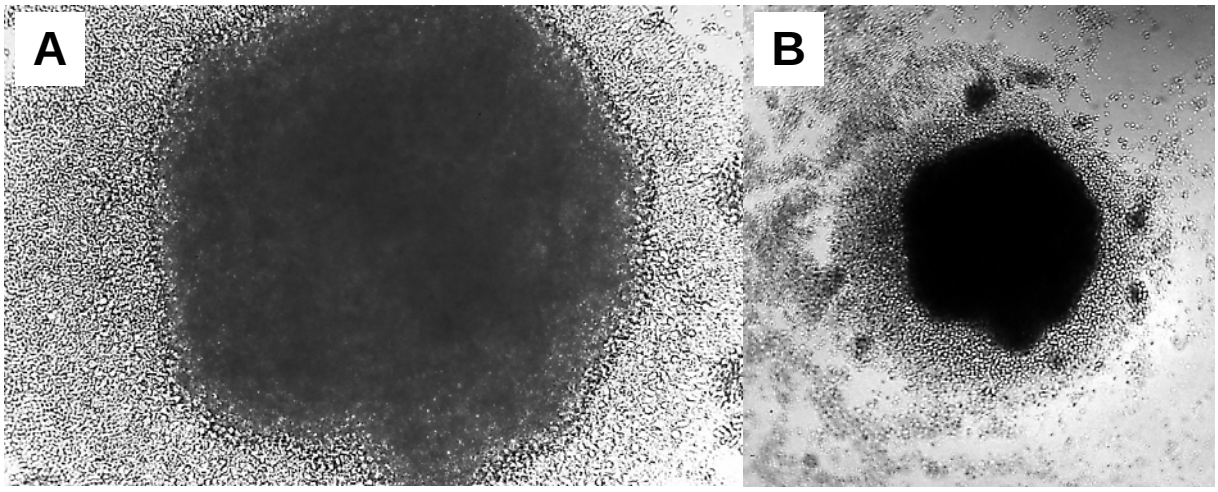


Abb. 3.2-2. Vitaler T-Zell-Klon 21 Tage nach Anlegen der Linie. Vergrößerung 20fach (A) bzw. 10fach (B).

Von diesem Zeitpunkt an wurde bei den Klonen alle zwei Tage die Hälfte des Mediums durch frisches Kloniermedium, dem, je nach Vitalität und

Wachstumsverhalten des Klones, final zwischen 20 und 80U/ml rekombinantes IL-2 zugesetzt waren, supplementiert. Waren die Plattenvertiefungen von dem Klon zu etwa 90% ausgefüllt, wurde der Klon 1:2 geteilt.

Schritt 3: Spezifitätstest, Charakterisierung der Klone (ab Tag 21)
Sobald der Klon vier Vertiefungen einer MTP mit 96 Kammern ausfüllte, wurde die Hälfte der Zellen für einen Spezifitätstest herangezogen, die andere Hälfte restimuliert.
Für den Spezifitätstest wurden autologe EBV-transformierte Zellen, die sich mindestens fünf Tage in Kultur befunden hatten, mit einer 4%igen Mitomycin C-Lösung für 2 Stunden inkubiert und so teilungsunfähig gemacht. Nach dem Waschen wurden sie gezählt und in Proliferationsmedium auf $8x10^5$/ml konzentriert. Je 100µl wurden in eine Kammer einer flachbödigen MTP mit 96 Vertiefungen pipettiert.
Zwei der vier Kammern je Klon wurden daraufhin mit 300µl Proliferationsmedium resuspendiert und auf drei Kammern der vorbereiteten flachbödigen MTP verteilt, von denen zwei Kammern 20µl einer 200µg/ml NiSO4-Lösung (entspricht 20µg/ml finaler Konzentration, Herstellung der Allergenlösung vgl. *Etablierung einer T-Zell-Linie*) und der verbleibenden Kammer 20µl Proliferationsmedium als Negativkontrolle zugegeben worden waren. Die Platten wurden für fünf Tage im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde die Proliferationsaktivität der Klone durch den H^3-Thymidin-Test nachgewiesen.

Die andere Hälfte der Klone wurde für die weitere Expansion restimuliert. Zu diesem Zweck wurden heterologe PBMC aus EDTA-Vollblut isoliert und mit einer 4%igen Mitomycin C-Lösung für 90min inkubiert. Den gewaschenen und auf eine Konzentration von $1,5x10^6$/ml eingestellten PBMC wurden 2% PHA und 40U IL-2/ml zugegeben. Je 1ml dieser Suspension wurde in eine Vertiefung einer 24kämmerigen MTP eingebracht.
Die verbleibenden Klone wurden in diese Platten suspendiert, jede Kammer wurde mit frischem Kloniermedium auf 2ml Endvolumen aufgefüllt.

Zwei Tage nach Restimulation wurde von jedem Klon 1ml Überstand asserviert und für die Analyse der Zytokinproduktion im ELISA bei -80°C eingefroren. Die Expansion erfolgte weiterhin nach einem dem Wachstumsverhalten angepassten flexiblen

Schema, wobei alle zwei Tage ein Medienwechsel mit Zugabe von IL-2 und etwa alle vier Wochen eine Restimulation durchgeführt wurden. Die Zellen wurden durch kontinuierliche Expansion und Kultivierung in MTP mit sechs Kammern in den Ruhezustand gebracht und entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder für Experimente herangezogen.

Analyse der Oberflächenexpression der Klone

Ob ein Klon CD4 oder CD8 auf der Membran exprimierte, wurde im Durchflußzytometer gemessen. Dazu wurden die T-Zellen in rundbödigen 96well-MTP 5min bei 4000rpm zentrifugiert, in PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern für 30min auf Eis inkubiert. Bei Doppelfärbungen schlossen sich ein weiterer Waschgang und die Inkubation mit dem zweiten Antikörper an. Die Zellen wurden bei 4°C erneut zentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde das FACS-Gerät mit einer Negativkontrolle kalibriert und die Auswertung vorgenommen.

Subtypenbestimmung der T-Zell-Klone

Der Subtyp der Klone wurde anhand des Zytokingehaltes im Überstand der maximal stimulierten Klone im Sandwich-ELISA bestimmt. Untersucht wurden die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN-γ unter Verwendung von ELISA-Kits der Firma *Becton Dicinson*. Am Vorabend des Versuches wurden ELISA-Mikrotiterplatten mit dem monoklonalen Primärantikörper beschichtet und über Nacht bei 6-8°C gelagert. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper mit einem Reagenz geblockt und anschließend die Standards in verschiedenen Konzentrationen sowie die Testsubstanzen für 2 Stunden zugegeben.

Die Zytokin-Antikörper-Bindung wurde mittels eines zweiten, Enzym-markierten Antikörpers nachgewiesen und erfolgte nach Zugabe des Substrates für 30min und Stoppen der Reaktion mittels H_2SO_4 durch Farbentwicklung im Spektrophotometer bei 420nm Wellenlänge.

3.2.2.2 Kultivierung humaner, primärer Keratinozyten

Von den Probanden, aus deren Blut Allergen-spezifische T-Zell-Klone etabliert worden waren, wurden autologe Keratinozyten aus iatrogen induzierten Blasen gewonnen und kultiviert.
Dazu wurde zunächst eine immortalisierte Mäuse-Fibroblasten-Linie (3T3-Zellen) für etwa eine Woche in Zellkultur-Flaschen in Kultur genommen. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen bei etwa 75% Konfluenz für zwei Stunden mit einer 2%igen Mitomycin C-Lösung inkubiert und teilungsunfähig gemacht. Der Zellrasen wurde mit PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen, die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, bei 360xg für 10min zentrifugiert, in Feedermedium aufgenommen und gezählt. In „T75“ Zellkulturflaschen wurden $1{,}5x10^6$ Zellen in 12,5ml Feedermedium, in „T25“ Flaschen $1x10^6$ Zellen in 7,5ml Medium gegeben. Die 3T3-Zellen dienten analog den PBMC bei der Klonierung als Feeder-Zellen, die den Keratinozyten eine natürlichere Umgebung (ähnlich wie bei der Wundheilung: ein auf Fibroblasten wachsender Keratinozyten-Zellrasen, vgl. Abb. 3.2-4) gewährleisten sollen.

Zur Gewinnung der Keratinozyten wurde die Epidermis an der Unterarm-Innenseite der Probanden desinfiziert und ein Plastikaufsatz, der fünf Hohlräume in Form einer Halbkugel aufwies, angebracht.

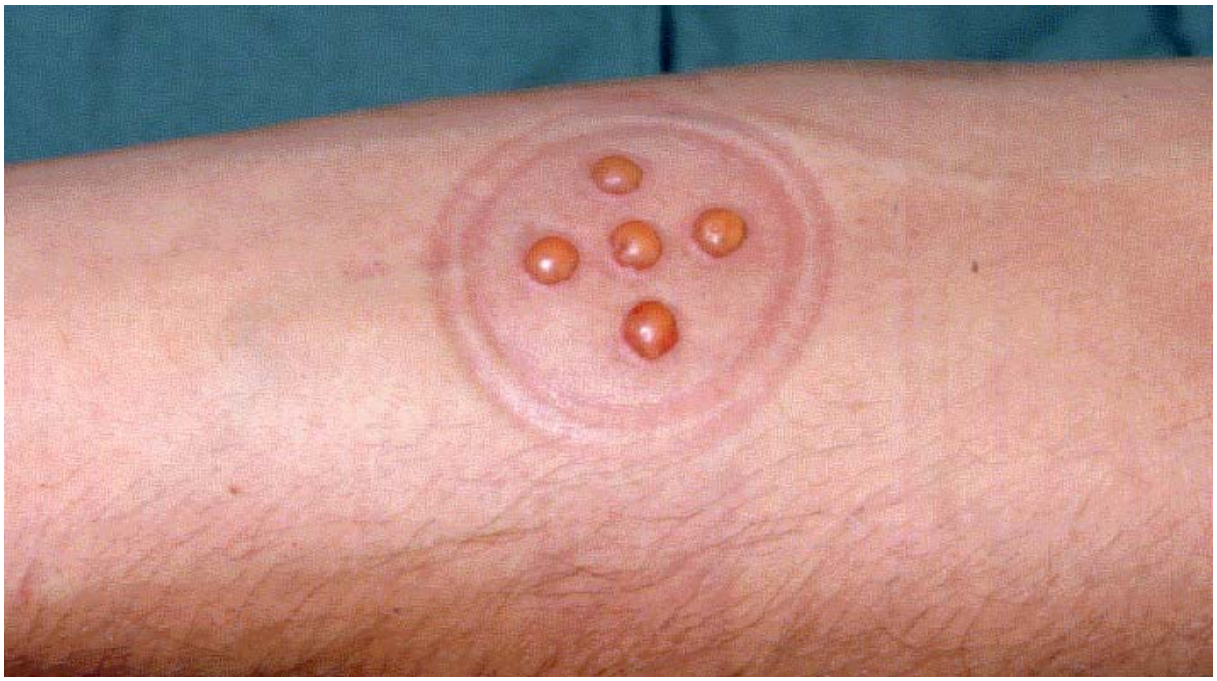


Abb.3.2-3. Iatrogen induzierte Blasen („suction blister“).

Durch eine Pumpe wurde in diesen Hohlräumen ein Vakuum erzeugt, das nach etwa zwei Stunden zu einer Blasenentwicklung in die Halbkugeln führte (vgl. Abb.3.2-3).
Die mechanisch angehobene Epidermis konnte mit chirurgischem Besteck abgetragen werden, ohne dass den Probanden Narben entstanden.

Die Epidermis-Stücke wurden für jeweils 30min in zwei Antibiotika-Lösungen eingetaucht. Anschließend wurden sie für 10min mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und dann die entstehende Suspension in Feedermedium gegeben, um die Zellen zu schonen.
Die verbleibenden Epidermis-Stücke wurden erneut in Trypsin-EDTA inkubiert. Der Vorgang wurde 10mal wiederholt, anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und die Zellen in Feedermedium gezählt.
Je $1x10^6$ Keratinozyten wurden in eine der mit den 3T3-Zellen vorbereiteten „T75“ Zellkulturflaschen in 12,5ml Feedermedium gegeben; bei geringerer Zellzahl wurden $5x10^5$ in 7,5ml in einer „T25“ Flasche kultiviert.

Nach drei Tagen wurde vorsichtig die Hälfte des Mediums durch frisches Feedermedium supplementiert. Von diesem Zeitpunkt an fand alle drei Tage ein Medienwechsel statt. Bei etwa 90% Konfluenz wurden die Keratinozyten mit Trypsin-EDTA vom Boden der Flasche abgelöst, gezählt und nach dem gleichen Schema bis zur zweiten bzw. dritten Passage erneut ausgesäht. Von jeder Passage wurden auch Zellen eingefroren.

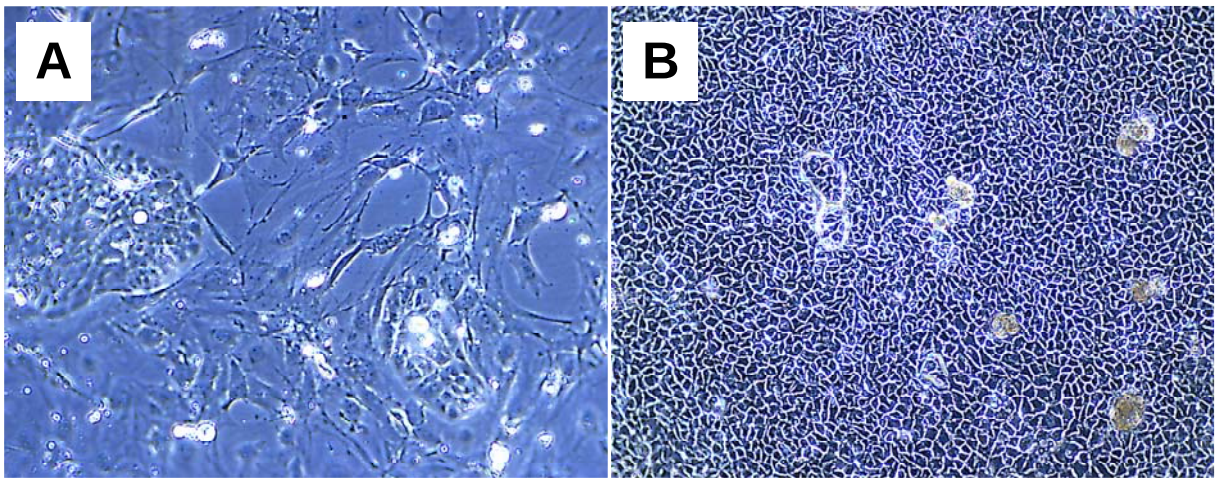


Abb. 3.2-4. Auf einem Fibroblastenrasen wachsende Keratinozyten-Nester 5 Tage (A) bzw. 12 Tage (B) nach Aussaht. Vergrößerung 20fach.

3.2.2.3 Generierung Dendritischer Zellen (DC)

Dendritische Zellen wurden aus aus dem peripheren Blut stammenden Monozyten durch Differenzierung generiert. Dazu wurden zunächst PBMC aus EDTA-Vollblut isoliert und durch Adhärenz (vgl. *Etablierung einer T-Zell-Linie*) in Monozyten und T-Zellen aufgetrennt. Die Monozyten wurden in HU-DC-Medium fünf Tage kultiviert, dem je 300 U/ml GM-CSF und IL-4 zugesetzt wurden. Nach drei Tagen fand ein Medienwechsel mit erneuter Zytokinsubstitution statt. Zwei weitere Tage später wurden die reifen DC gezählt und für den Versuchsansatz verwendet.

3.2.2.4 Kokultur-Experimente

Die wechselseitige Beeinflussung zwischen Allergen-spezifischen T-Zell-Klonen und autologen primären Keratinozyten im Allergiemodell wurde durch Kokultivierung von T-Zell-Klonen, Allergen-präsentierenden Zellen und Keratinozyten in An- oder Abwesenheit des Allergens untersucht.
Die Keratinozyten wurden fünf Tage vor der Koinkubation aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und in Kultur gebracht: $8x10^4$ Zellen/Kammer wurden in einer 24well-Mikrotiterplatte in Keratinozytenmedium mit Hydrocortison ausgesäht. Am nächsten Tag wurde ein vorsichtiger Medienwechsel vorgenommen, um die vitalen adhärenten Zellen von den in Suspension befindlichen toten Zellen und Zellfragmenten zu trennen. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde ein Mediumwechsel auf Keratinozytenmedium ohne Hydrocortison durchgeführt. Am Versuchstag wurden die Keratinozyten mittels Trypsin-EDTA-Lösung in Suspension gebracht, zentrifugiert und in Proliferationsmedium auf $2x10^5$ Zellen eingestellt; pro Kammer wurden 50µl der Suspension, entsprechend $1x10^4$ Zellen, pipettiert.

Als Allergen-präsentierende Zellen wurden entweder aus autologem, frischem EDTA-Vollblut isolierte Monozyten, mittels Mitomycin C teilungsunfähig gemachte autologe EBV-transformierte Zellen oder aus PBMC generierte autologe DC verwendet. Die Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von $8x10^5$/ml Proliferationsmedium (bei DC $5x10^4$/ml) in flachbödige 96well-MTP pipettiert.

Für jede Kondition wurde das spezifische Allergen $NiSO_4$ (in einer Konzentration von 20µg/ml) und Proliferationsmedium als Negativkontrolle untersucht.

Die T-Zell-Klone wurden zunächst durch Expansion und Aussähen in 6well-Mikrotiterplatten in einen Ruhezustand gebracht. Ruhende T-Zellen wurden in einer Konzentration von $1x10^6$/ml in Proliferationsmedium in die MTP mit Allergen-präsentierenden Zellen pipettiert.

Bei dem Versuchsansatz wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Pipettieren des Allergens auf die Allergen-präsentierenden Zellen und dem Zugeben der Keratinozyten mindestens 30min Zeit verging, um eine suboptimale Allergenpräsentation durch sterische Effekte unwahrscheinlicher zu machen.

Der Versuchsansatz wurde nach vier Tagen mit der H^3-Thymidin-Methode ausgewertet, Überstände wurden zuvor asserviert und deren Zytokingehalt im ELISA gemessen.

Unterschiedliche Konditionen der in Koinkubationen eingebrachten Keratinozyten
Um die Abhängigkeit eines während der Koinkubationen eventuell beobachteten Effektes von Differenzierung und Aktivierung der Keratinozyten abschätzen zu können, wurden diese im Vorfeld der Versuche unterschiedlich vorbehandelt:
In einigen Versuchen wurde der Effekt einer Vorstimulation der Keratinozyten mit IFN-γ untersucht. Dazu wurde die Hälfte der in Adhärenz befindlichen Zellen 24 Stunden vor der Koinkubation mit Medium inkubiert, das mit 300U/ml rekombinantem IFN-γ versetzt war.

In einem weiteren Experiment wurde die mit dem Differenzierungsgrad einhergehende Kulturzeit der Keratinozyten vor der Koinkubation variiert; neben den üblichen fünf Tagen wurden einige Keratinozyten elf Tage vor dem Versuchsansatz aufgetaut und in der Konzentration von $5x10^4$ Zellen/well in Kultur genommen.

Ein dritter Ansatz bestand in der Verwendung heterologer Keratinozyten für die Koinkubationen, um die Beteiligung MHC-restringierter Prozesse abschätzen zu können.

In drei Koinkubationsexperimenten schließlich wurde einigen Keratinozyten die den Golgi-Apparat der Zellen hemmende Substanz Brefeldin A (BFA) in einer Konzentration von 50µM für 2 Stunden zugegeben. Die Zellen wurden anschließend viermal mit PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und wie gewohnt durch Trypsinierung in Einzelzell-Suspension gebracht.
Damit sollte ein Eindruck darüber gewonnen werden, ob die zugrunde liegenden Prozesse eines eventuellen Effektes auf zum Zeitpunkt der Koinkubation bereits vorhandene Rezeptor- und Mediator-Proteine zurückzuführen sein könnten oder ob diese Proteine von Keratinozyten auf Kontakt mit autologen T-Zellen hin *de novo* synthetisiert würden.

3.2.2.5 Statistische Analyse

Die im immunhistochemischen Teil dieser Arbeit aufgeführten Daten stellen die Mittelwerte aus Biopsien verschiedener Patienten dar. Handelte es sich um zwei Patienten, so ist zusätzlich die Mittelwertabweichung, bei Patientenzahlen >2 die Standardabweichung angegeben.
Im zweiten Teil der Arbeit sind Mittelwerte unterschiedlich häufig wiederholter *in vitro* Experimente aufgeführt, bei denen ebenfalls die Mittelwert- bzw. die Standardabweichung angegeben sind.
Statistische Analysen signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen Student´schen T-Testes durchgeführt. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

4.1.1 Klinische Parameter

Patienten, die an AE litten und einen positiven APT aufwiesen (Gruppe I) entwickelten auf Provokation mit nativem Pollen nach 24 bis 48 Stunden ein akutes Ekzem (vgl. Abb. 4.1-1), das von einem lokalen ödematösen Erythem umgebene Papeln und Vesikel aufwies – in seiner Gesamtheit das klinische Bild einer Immunreaktion vom verspäteten Typ (Typ IV).

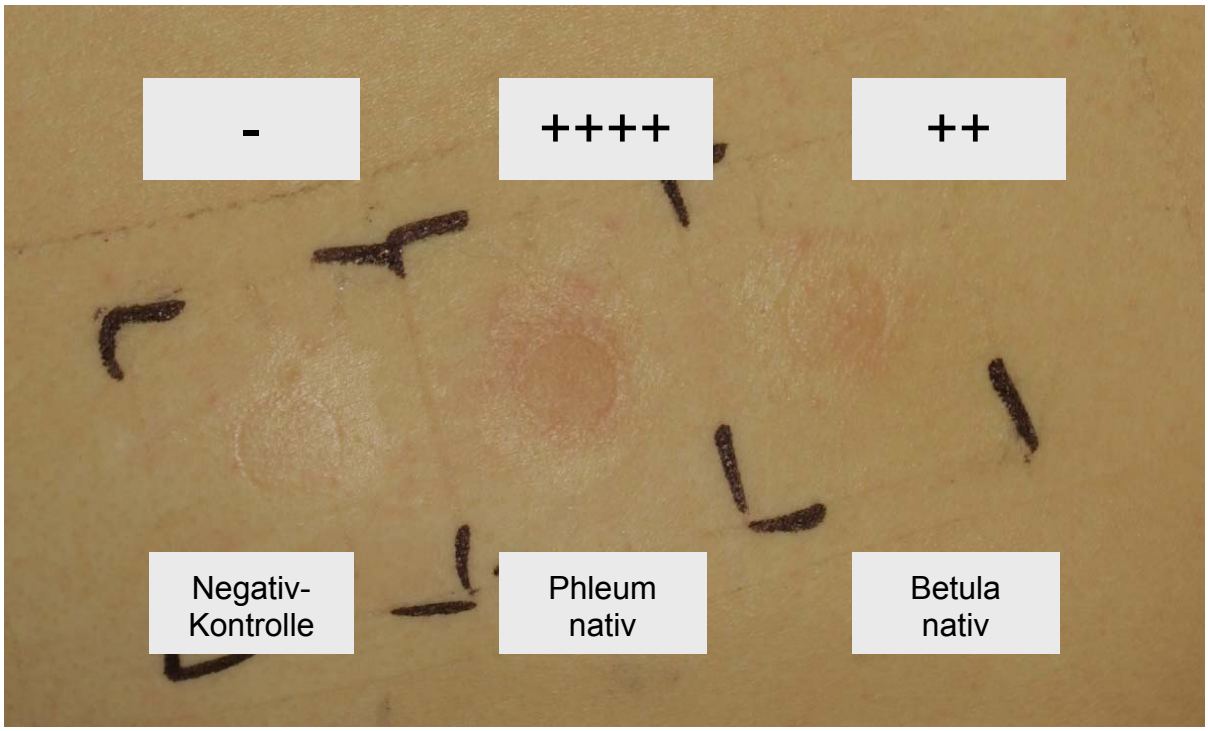


Abb. 4.1-1 Entwicklung eines akuten Ekzems auf nativen Pollen nach 48h (Patient KE, Gruppe 1).

Die Patienten mit einer Nickelallergie (Gruppe II) reagierten auf den Nickel-Epikutantest nach 48 Stunden mit einer klinisch identischen Immunreaktion, während dieser Test nach 24 Stunden negativ ausfiel oder allenfalls ein leichtes Erythem beobachtet werden konnte.

Sowohl die Probanden, die in die Kontrollgruppe (Gruppe III) einbezogen worden waren, als auch die Negativkontrollen mit Vaseline (dem Trägerstoff der Allergene) der Gruppen I und II, blieben klinisch unauffällig.

4.1.2 Histologie: Nachweis eines entzündlichen Infiltrates in den Positiv-Biopsien (Gruppe I und II)

Die histologische und immunhistochemische Untersuchung der gewonnenen Biopsien ergab ein starkes zelluläres Infiltrat aus mononukleären Zellen in den klinisch mit einer Ekzemreaktion auffallenden Biopsien (Allergenprovokation bei Patienten der Gruppen I und II), während die Vaseline-Negativkontrollen kein und die Schnitte der Negativgruppe aus den mit Pollen provozierten Gebieten kaum ein solches Infiltrat aufwiesen (vgl. Abb. 4.1-3).
Der Nachweis der Immunzellen ging mit histologischen Zeichen der Hautschädigung wie Akantholyse und interzellulärem Ödem (Spongiose) einher. Der Hauptteil der eingewanderten Zellen fand sich in der Dermis, in Gebieten starker Hautschädigung ließ sich darüber hinaus ein Epidermotropismus der Zellen nachweisen (vgl. Abb. 4.1-2).

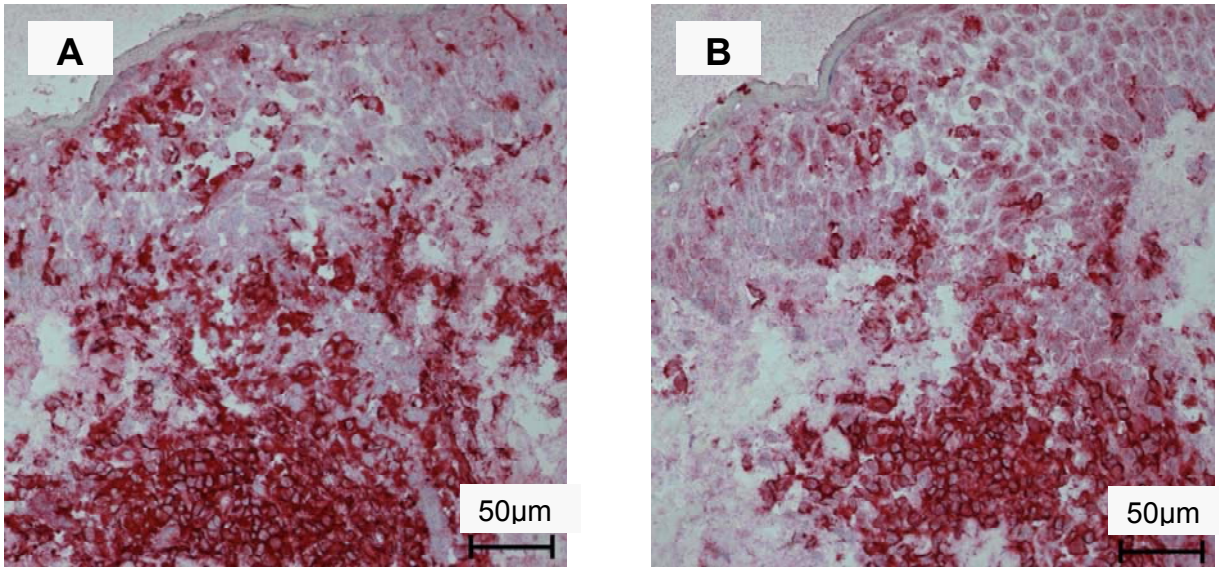


Abb. 4.1-2 Mononukleäres Infiltrat in Dermis und Epidermis, Spongiose und Apoptose-Zeichen in der Epidermis (Biopsie aus Gruppe I, Patient KE, nach 48h, Färbung anti-CD4 [A] bzw. anti-CD3 [B]); Die Skalen entsprechen 50µm.

Dabei fanden sich zwischen den Biopsien aus APTs von Patienten der Gruppe I und denen aus NPTs von Patienten der Gruppe II qualitativ keine Unterschiede; die Quantität der einwandernden mononukleären Zellen allerdings war bei den Nickel-Epikutantests etwas größer. Im Zeitverlauf ergaben sich deutliche Unterschiede: während in Schnitten aus APTs bereits nach 24 Stunden ein deutliches Infiltrat nachweisbar war und der Höhepunkt der Reaktion bei 48 bis 72 Stunden nach Allergenprovokation lag, konnte in den Epikutantests nach 24 Stunden allenfalls ein leichtes Infiltrat beobachtet werden, der Höhepunkt dieser Reaktion lag bei 72 bis 96 Stunden nach Provokation. Die Reaktion auf Pollen dagegen ging nach 96 Stunden ungefähr auf den Entzündungswert der chronischen AE-Läsion (vgl. Abb. 4.1-3) zurück.

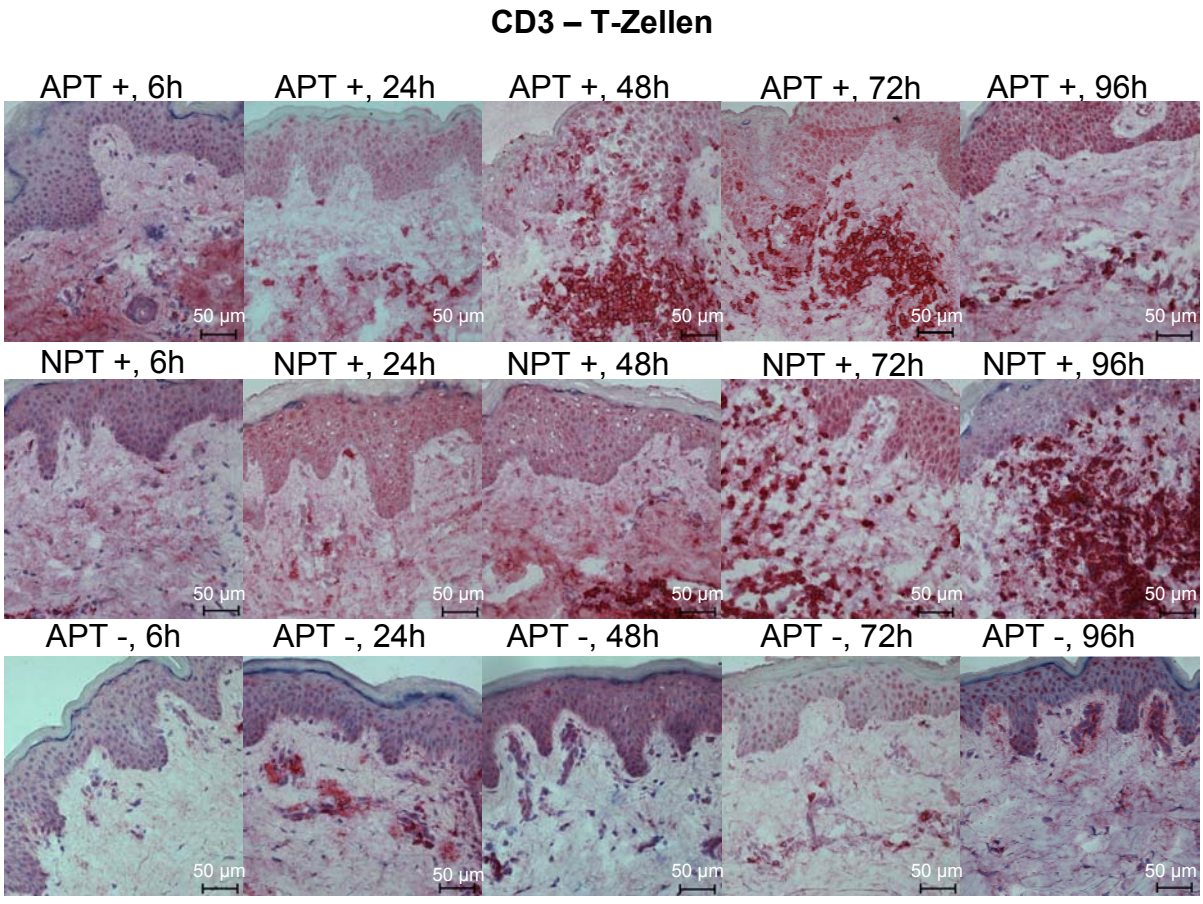


Abb. 4.1-3. Übersicht über den Zeitverlauf der Immmunreaktionen gegen Nickel (oben) und gegen Pollen (Mitte) sowie der Kontrollgruppe (unten): Biopsien eines Patienten aus Gruppe I (APT+), Gruppe II (NPT+) und Gruppe III (APT-); Färbung anti-CD3. Die Skalen entsprechen 50µm.

4.1.3 Immunhistochemie: Charakterisierung des entzündlichen Infiltrates

Eine immunhistochemische Charakterisierung und Quantifizierung des mononukleären Infiltrates in Schnitten der Gruppen I und II ergab, dass es sich bei den einwandernden Zellen zu 90% um CD3+CD4+ T-Zellen handelte (vgl. Abb. 4.1-4a).

Nur ungefähr 10% der T-Zellen waren CD8+, wobei diese Population im Falle der Immunreaktion auf Nickel über den untersuchten Zeitverlauf konstant anstieg (vgl. Abb. 4.1-4a).

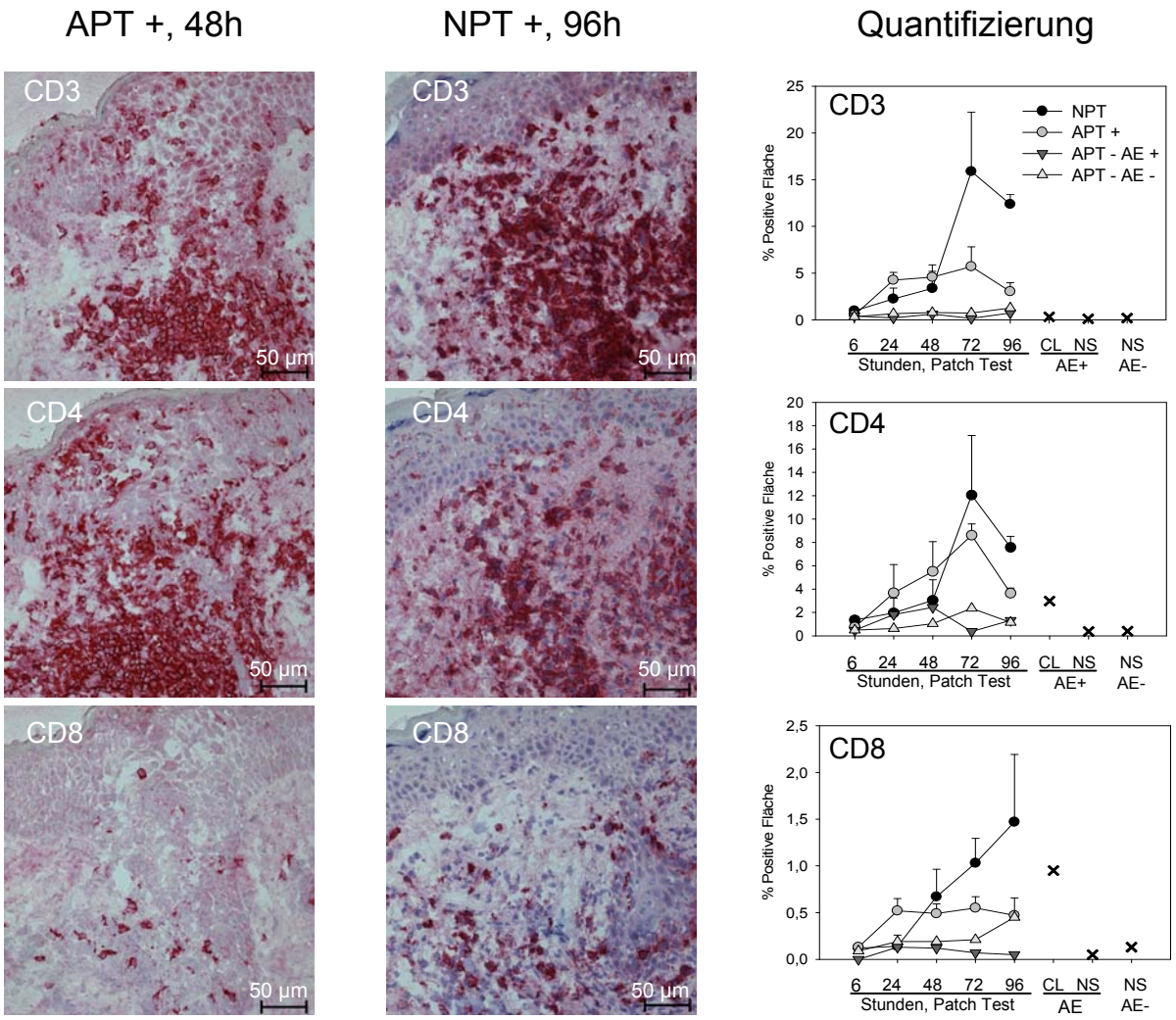


Abb. 4.1-4a. Übersicht über die Charakterisierung des T-zellulären Infiltrates aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

Die weitere Charakterisierung zeigte, dass ca. 20% der T-Zellen CD25+ waren, eine Eigenschaft von aktivierten T-Zellen; CD25 ist darüber hinaus ein Differenzierungsparameter einer Subpopulation von T-regulatorischen Zellen. CD25+ Zellen waren im abklingenden Teil der Ekzemreaktion, bei der Provokation mit Pollen nach 72 Stunden und bei der verzögert einsetzenden Reaktion auf Nickel nach 96 Stunden, vermehrt nachzuweisen (vgl. Abb. 4.1-4b).

Die große Mehrheit der Zellen (>90%) exprimierte darüber hinaus CD45RO, einen Marker für T-Gedächtniszellen, die im Laufe ihres Zyklus schon Antigenkontakt gehabt hatten (vgl. Abb. 4.1-4b).

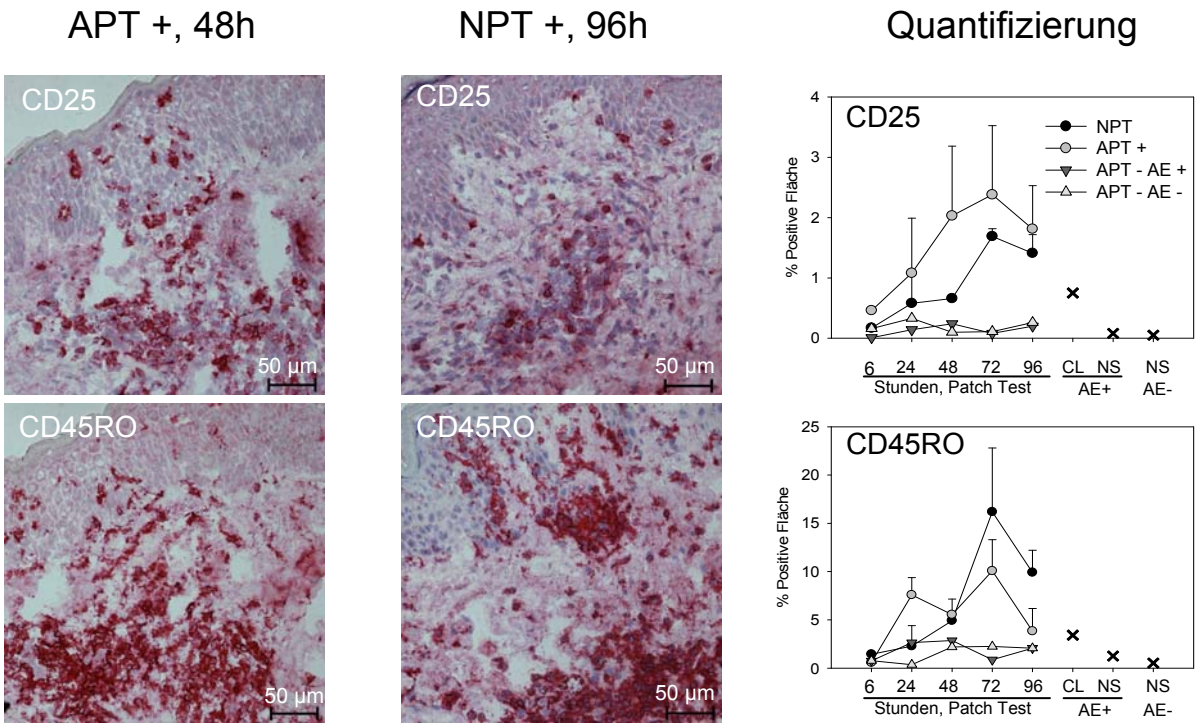


Abb. 4.1-4b. Weitere Charakterisierung des T-zellulären Infiltrates aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

4.1.4 Beteiligung des innaten Immunsystems

Die gewonnenen Biopsien wurden auf Marker des Monozyten-Makrophagen-Systems hin untersucht; gefärbt wurden die Antikörper FcγRI (CD64), der besonders von Monozyten exprimiert wird und CD68, der Makrophagen darstellt.
Es zeigte sich, dass sowohl CD64 als auch CD68 in den Patchtests der Gruppen I und II in den ersten 72 Stunden nach Provokation kontinuierlich anstiegen; nach 96 Stunden war die Zahl etwas zurückgegangen (vgl. Abb. 4.1-4c).

Auch in den Kontrollbiopsien der Gruppe III konnten zunächst größere Mengen CD64 und CD68 nachgewiesen werden, bereits nach 72 Stunden war bei hautgesunden Probanden jedoch wieder der Ausgangswert erreicht, während die Ekzempatienten aus der Kontrollgruppe einen, wenn auch in etwas geringerer Intensität, ähnlichen Reaktionsverlauf wie die Patienten der Gruppe I zeigten (vgl. Abb. 4.1-4c).

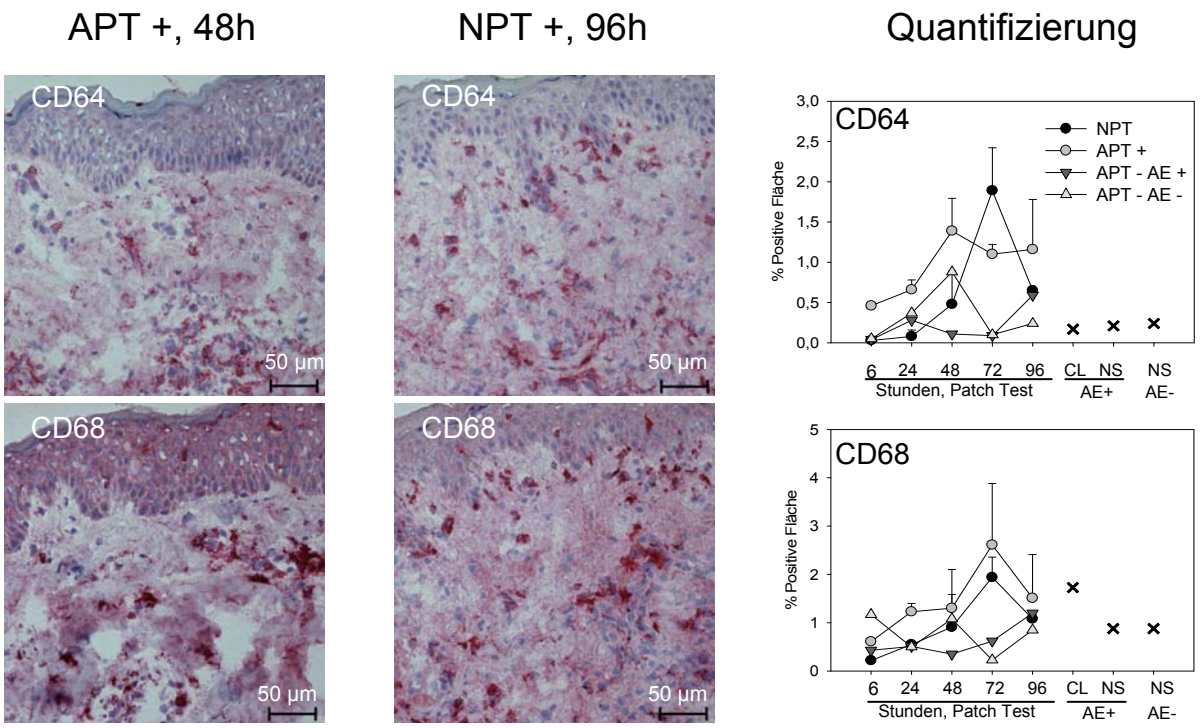


Abb. 4.1-4c. Marker des innaten Immunsystems aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

4.1.5 Allergen-Präsentation

Neben Quantität und Zusammensetzung der professionellen APC-Populationen wurde als Endpunkt die Menge an vorhandenem IgE ermittelt.

In den Biopsien aus den Gruppen I und II ließ sich bereits nach 24 Stunden im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen eine deutlich höhere Konzentration von CD1a+ Zellen nachweisen, wobei dieser Marker in den APT-Schnitten (Gruppe I) bis zum Abklingen der Reaktion nach 96 Stunden stärker exprimiert war als in Biopsien aus NPT; dieser Unterschied war nach 72 Stunden signifikant (p = 0,037), (vgl. Abb. 4.1-4d).

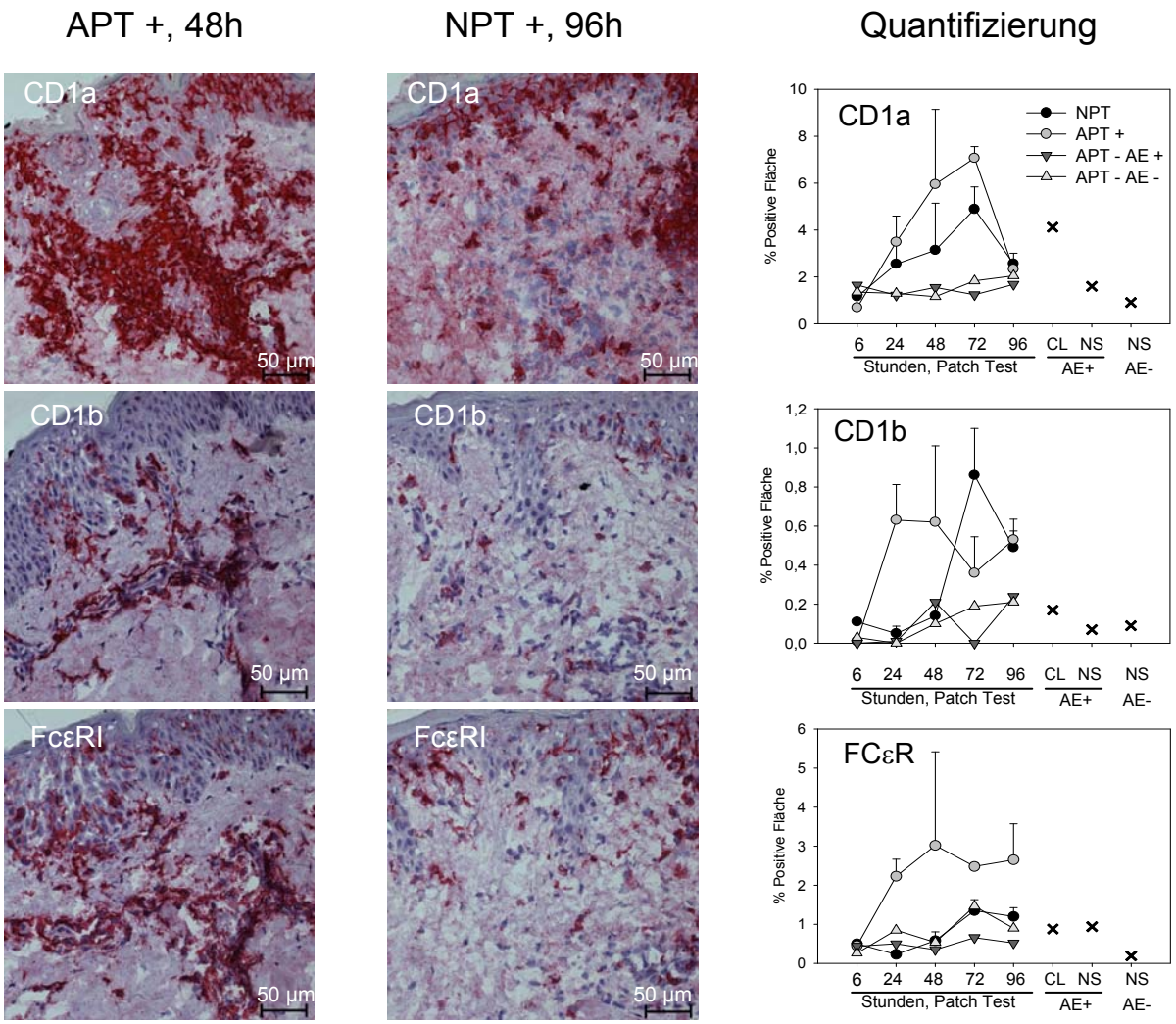


Abb. 4.1-4d. Marker der Antigen-Präsentation in je einer Biopsie aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

Auch FcεRI, der besonders von IDEC exprimiert wird, war im APT in höheren Konzentrationen nachweisbar, wobei sich gegenüber dem NPT signifikante Unterschiede nach 24 (p = 0,044) und 72 (p = 0,013) Stunden ergaben (vgl. Abb. 4.1-4d).
Die über den Zeitverlauf nachgewiesene Menge des auf IDEC stark exprimierten CD1b sowie des von pDC exprimierten BDCA-2 imitierte die Charakteristik der Marker des mononukleären Infiltrates: beide Antikörper waren im APT deutlich früher nachzuweisen. So war die Expression von CD1b nach 24 und nach 48 Stunden größer im APT. Nach 72 Stunden waren die beiden Marker stärker im NPT nachzuweisen (vgl. Abb. 4.1-4d, 4.1-4e).

In der chronischen Läsion des atopischen Ekzems konnten im Vergleich zu den Werten in klinisch unauffälliger, nicht provozierter Haut von Atopikern und gesunden Probanden und zu den Kontrollgruppen deutlich größere Mengen an CD1a+ Zellen nachgewiesen werden, während die Antikörper gegen IDEC, FcεRI und CD1b, nur geringfügig, BDCA-2 überhaupt nicht vermehrt nachzuweisen waren.

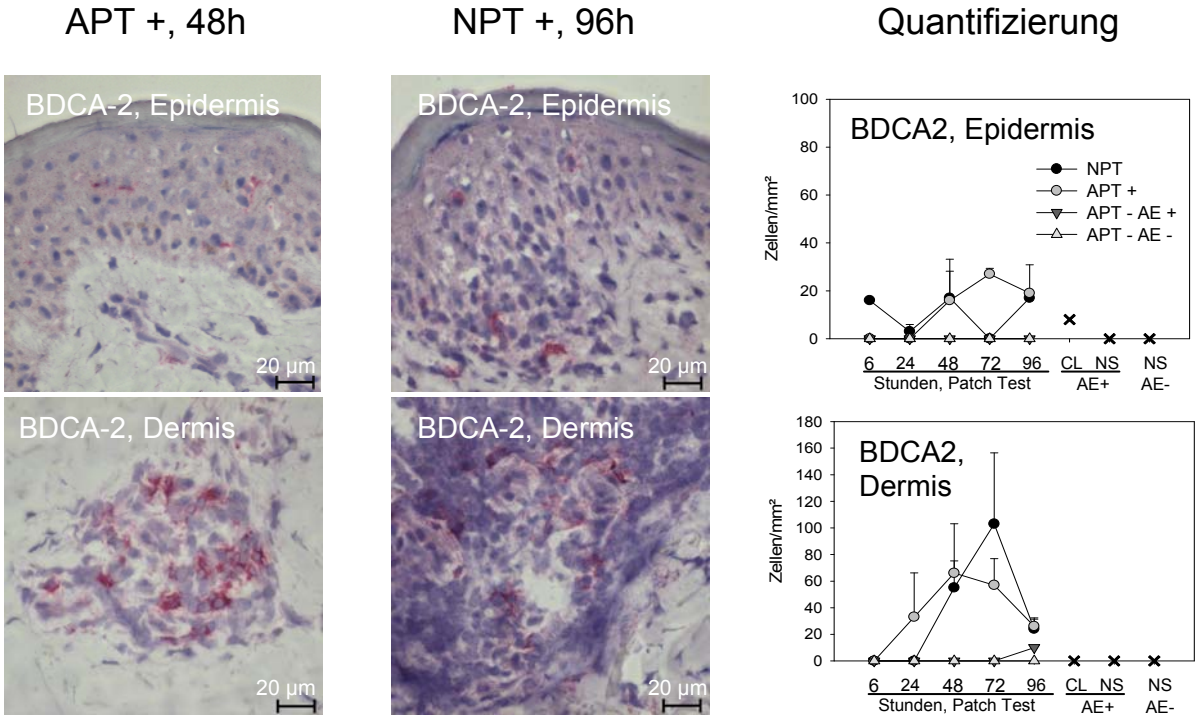


Abb. 4.1-4e. Marker für pDC, BDCA-2, in je einer Biopsie aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

In den Biopsien der Gruppe I konnte über den untersuchten Zeitverlauf eine Crescendo-Decrescendo-Reaktion für IgE nachgewiesen werden, wobei die höchste Konzentration nach 24 Stunden erreicht wurde. Diese Antikörper wurden in Biopsien von Patch-Tests gesunder Haut und in den Biopsien der Gruppe II nicht gefunden. Zu einem sehr geringen Grad waren sie in den Biopsien von Pollenallergikern mit negativem APT (Gruppe III) nachweisbar, allerdings ohne zeitabhängigen Verlauf und nicht in signifikantem Ausmaß (vgl. Abb. 4.1-4f).

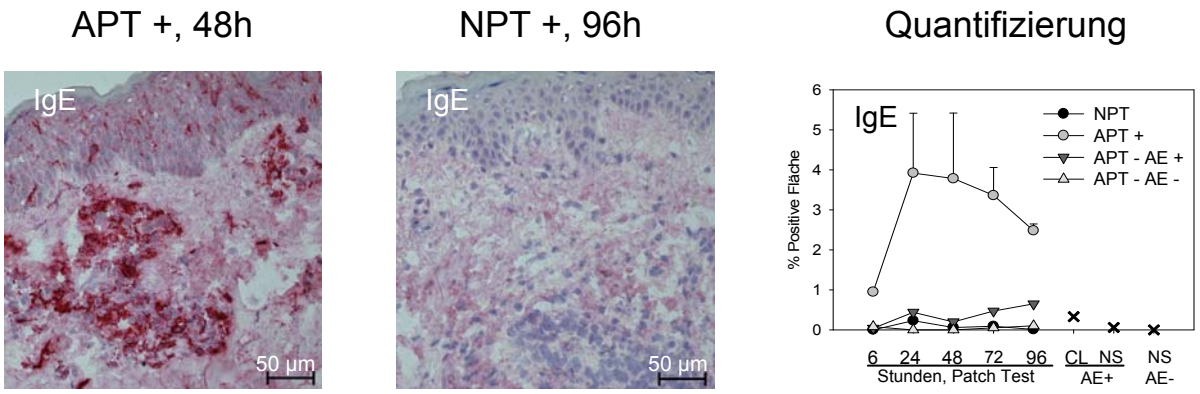


Abb. 4.1-4f. IgE in je einer Biopsie aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson).

4.1.6 Zytokinproduktion der Immunzellen

Um festzustellen, ob die eingewanderten T-Zellen eher dem Th1- oder dem Th2-Subtyp angehörten, wurde die Produktion von IFN-γ (Th1) und IL-5 (Th2) untersucht (vgl. Abb. 4.1-4g).

Die Färbung von IL-4 als klassischem Th2-Zytokin wurde aus technischen Gründen zurückgestellt. Dieses Zytokin ist schwer nachweisbar, unter anderem wohl aufgrund der Tatsache, dass es als Wachstumsfaktor der T-Zellen in sehr kurzer Zeit verstoffwechselt wird.

Es zeigte sich, dass besonders zu Beginn der Immunantwort (nach 24 Stunden) auf Pollen die IL-5-Produktion dominierte, während dessen Bedeutung zumindest mengenmäßig im weiteren Verlauf der Reaktion zurückging.

Im NPT war IFN-γ über den gesamten beobachteten Zeitverlauf wesentlich stärker exprimiert als IL-5 (vgl. Abb. 4.1-4g).

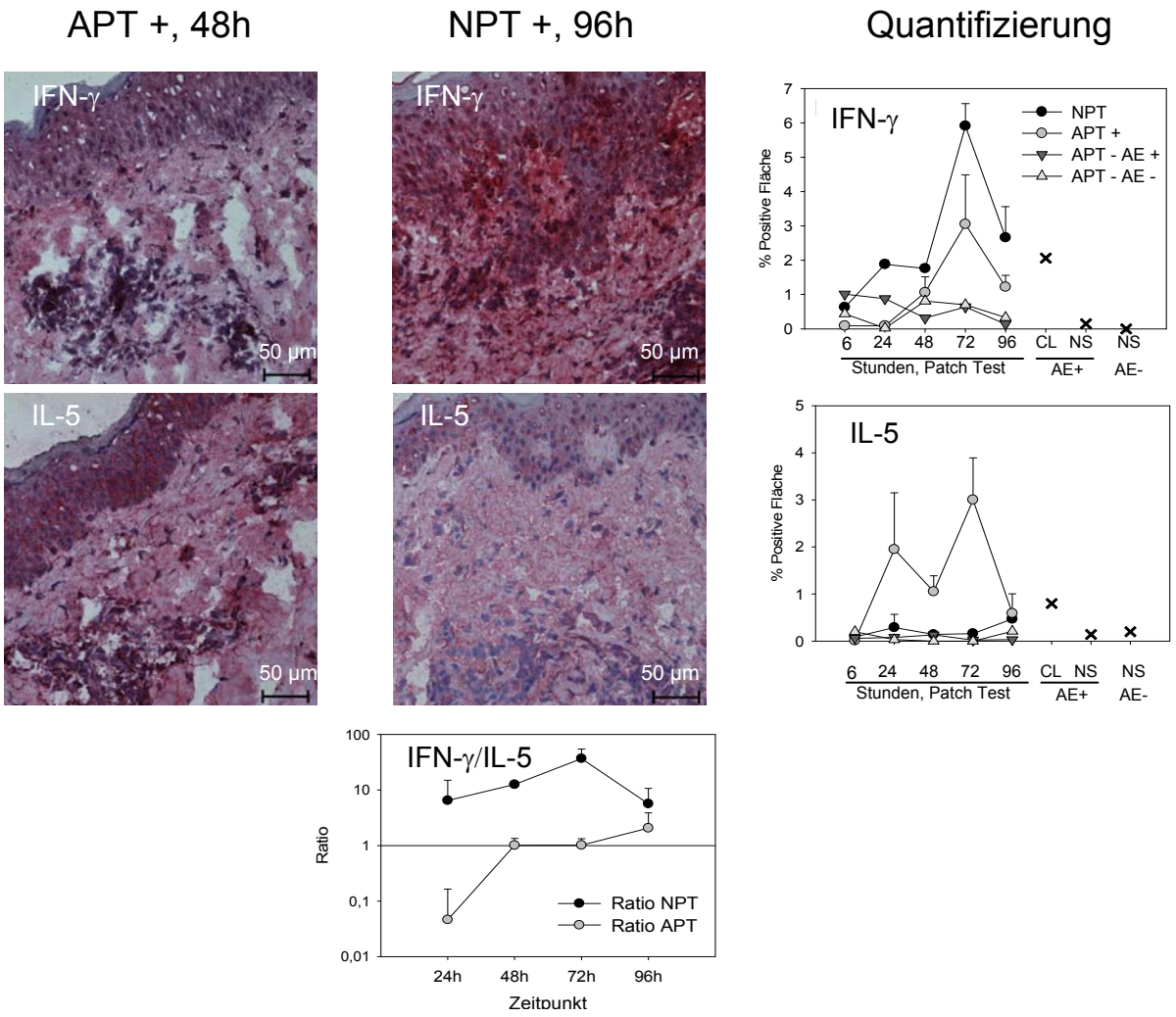


Abb. 4.1-4g. Vergleich des Zytokinprofils der T-Zellen je einer Biopsie aus Gruppe I (APT+) und aus Gruppe II (NPT+), wobei jeweils der Zeitpunkt der maximalen Reaktion (APT: 48h, NPT: 96h) gezeigt ist. Rechts die Quantifizierung des entsprechenden Markers (CL = chronisches AE; NS = Biopsien aus klinisch unauffälliger Haut; AE+ = Atopiker; AE- = gesunde Kontrollperson). Unten dargestellt die Ratio aus IFN-γ und IL-5 in den Biopsien der beiden Positivgruppen.

Dies wird durch die Bildung des Quotienten t aus der IFN-γ- und der IL-5-Konzentration in den Biopsien deutlich:

$$t = \text{IFN-}\gamma/\text{IL-5},$$

wobei IFN-γ die morphometrisch bestimmte Fläche positiver Antigen-Antikörper-Reaktionen des Typ1-Zytokins und IL-5 die produzierte Menge des Typ2-Zytokins in den quantifizierten Biopsien seien.

Während t in Gruppe I zu Beginn der Reaktion 24 Stunden nach Allergenprovokation deutlich unter dem Wert 1 lag, die IL-5-Produktion also dominierte, war der Quotient im späteren Verlauf der Immunreaktion größer als 1, die Immunantwort somit eher durch IFN-γ geprägt. Dagegen war der Quotient bei Biopsien der Gruppe II zu allen Zeitpunkten deutlich größer als 1, die Immunantwort also durch IFN-γ bestimmt.
Somit kann man im Falle der Abwehrreaktion auf Nickel von einer Th1-vermittelten Immunantwort ausgehen, während das Zytokinprofil der einwandernden T-Zellen bei der Immunantwort auf Pollen biphasisch zu sein scheint: im Anfangsstadium eher Th2, in der Spätphase der Reaktion eher Th1-beeinflusst.

Die Zytokinproduktion in den Biopsien der Ekzem-Patienten der Gruppe III zeigte eine mäßige IFN γ-Positivität bei kaum nachweisbarem IL-5, insgesamt war die Zytokinproduktion in den Kontrollbiopsien gering und ließ keinen zeitabhängigen Verlauf erkennen.

4.2 *In vitro*-Ekzem-Modell

4.2.1 Proliferation der T-Zell-Linien

Aus peripherem venösen Blut isolierte T-Zellen der Patienten SH und ID (Gruppe II, Nickelallergiker) proliferierten in Anwesenheit von autologen Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten) und Nickel (20µg/ml $NiSO_4$) signifikant (vgl. Tab. 4.2-1), wobei die spezifische Proliferation durch den Koeffizienten aus der Proliferation in Anwesenheit von Allergen und der auf Medium definiert wurde:

PI = Proliferation+Allergen/ Proliferation+Medium

Der so erhaltene Proliferationsindex (PI) wurde < +0,5 sowie > +2 als signifikant gewertet.

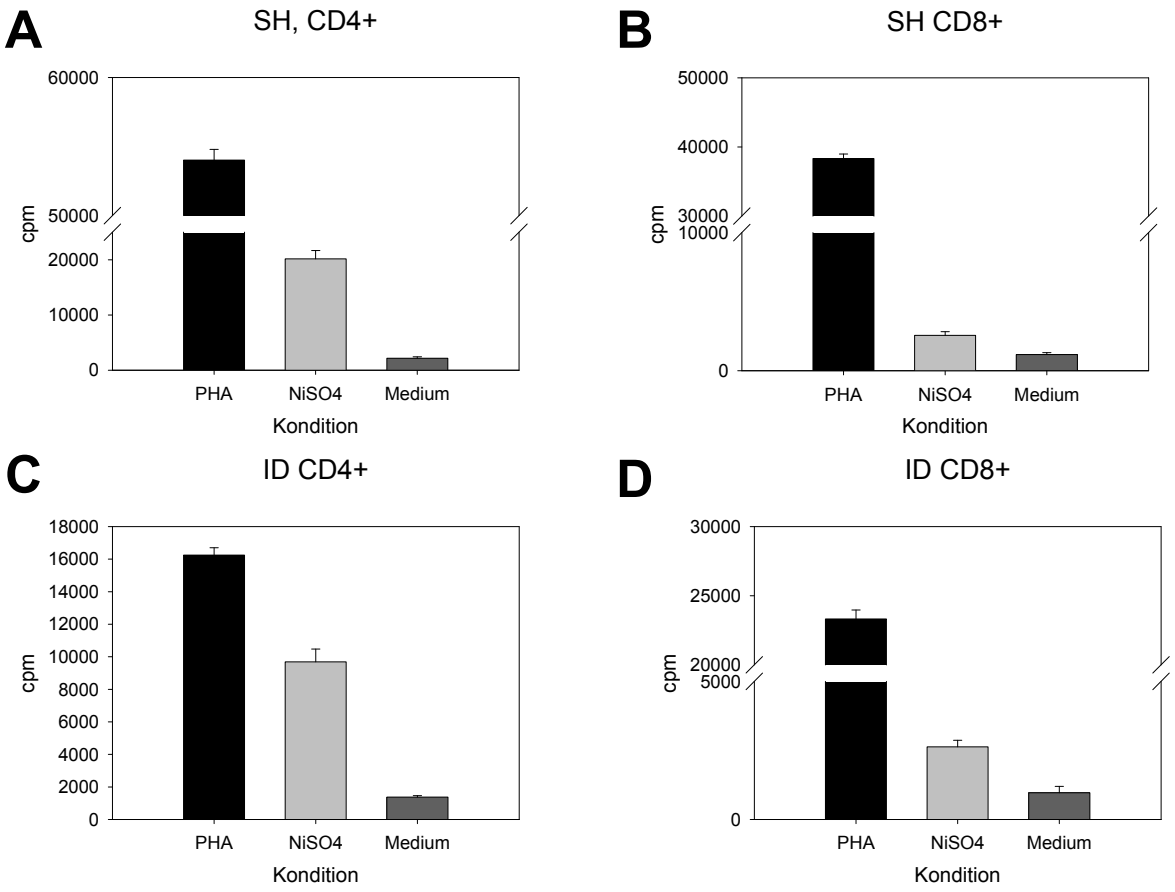


Abb. 4.2-1. Proliferationsindices der Linien SH (A, C) und ID (B, D). Die schwarz hinterlegten Werte geben den PI wieder.

Um die gemessene Proliferationsaktivität um die Qualität der Aktivierung zu erweitern und damit den Nachweis einer spezifischen Reaktion der T-Zellen auf das Allergen zu erhärten, wurde die Zytokinfreisetzung der Ansätze durch vorsichtiges Asservieren von Überständen nach 48 Stunden mittels ELISA gemessen.
Untersucht wurden dabei die Zytokine IFN-γ, IL-4 und IL-10.
Abbildung 4.2-2 ist zu entnehmen, dass die T-Zellen, die mit Nickel inkubiert wurden, deutlich größere Mengen an IFN-γ sezernierten als die im Kontrollansatz, während die produzierte Menge nach Stimulation mit der Positivkontrolle PHA oberhalb des Messbereichs lag (Daten nicht gezeigt). In Kongruenz zur Proliferation zeigten die CD4+ T-Zellen dabei eine höhere Zytokinproduktion als die CD8+ Linien.
Auch IL-4 wurde von mit Nickel stimulierten Zellen etwas vermehrt ausgeschüttet, hier erwies sich der Unterschied aber als gering, während in Überständen der Positivkontrolle deutlich erhöhte Mengen an IL-4 gemessen wurden (vgl. Abb 4.2-2B).
Dagegen war die Konzentration von IL-10 nach Stimulation mit Nickel im Vergleich zur Kontrolle unverändert, nur mit PHA inkubierte T-Zellen produzierten große Mengen dieses Zytokins (vgl. Abb 4.2-2C).

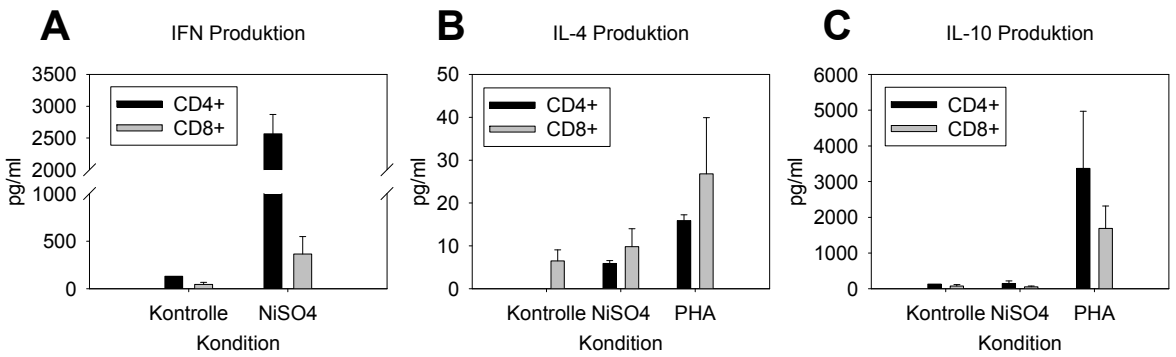


Abb. 4.2-2 Zytokinproduktion der T-Zell-Linien SH und ID: gezeigt die Menge im nach 48 Stunden asservierten Überstand an IFN-γ (A), IL-4 (B) und IL-10 (C) pro 10^5 T-Zellen.

4.2.2 Wachstum und Charakterisierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone

Bei jeder Klonierung wurden sowohl für die CD4+ als auch für die CD8+ Linie vier 96well MPT angesetzt, deren äußere Ränder ausgespart wurden. Somit wurden 60 Kammern pro Platte, insgesamt 240 Plattenvertiefungen pro Kondition, angesetzt.

In diesen 480 wells der Klonierungen SH und ID der Linien mit CD4+ T-Zellen wuchsen 85, in den wells der CD8+ T-Zell-Linien 117 Klone (vgl. Abb. 4.2-3).

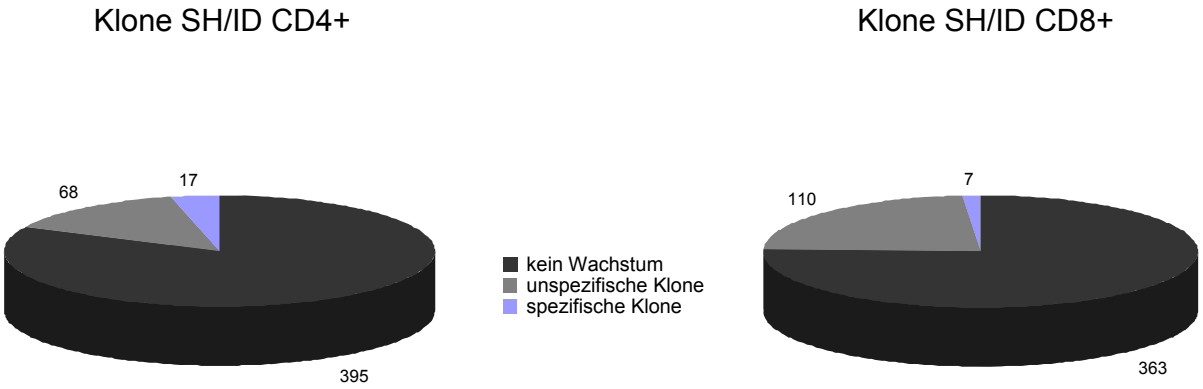


Abb. 4.2-3. Häufigkeit des Klonwachstums in den CD4+ (A) und den CD8+ (B) Linien, Anteil der spezifischen Klone.

Von den 85 CD4+ Klonen waren 17 für Nickel spezifisch, was 20% entspricht. Bezieht man diesen Prozentwert auf den mittleren Proliferationsindex der T-Zell-Linien SH und ID, so ergibt sich eine Konstante, mit der sich bei bekannter Gesamtzahl der Klone eine prädiktive Aussage über den prozentualen Anteil an spezifischen Klonen machen lässt:

$$\% \text{ spezifische Klone} = PI \text{ Linie}/x,$$

wobei PI der Proliferationsindex der Linie und x die spezifische Konstante seien. Der Wert dieser Konstanten beträgt nach Auswertung der Linien SH und ID 0,410.
Aus der Multiplikation der Gesamtzahl der Klone mit oben erhaltenem Ergebnis lässt sich die zu erwartende absolute Zahl der spezifischen Klone errechnen, die bei der Linie SH beispielsweise zwischen 11 und 12 gelegen hätte (tatsächliche Anzahl = 12):

$$9{,}4/0{,}436 = 22{,}9\%, \text{ bei insgesamt 50 Klonen entsprechend } 11{,}5 \text{ Klone}$$

Von den 117 CD8+ Klonen erwiesen sich 7 als Nickel-spezifisch, entsprechend 6%. Dieser geringere Prozentwert korreliert mit den niedrigeren Proliferationsindices der CD8+ Linien, so dass sich für die prädiktive Konstante x ein praktisch identischer Wert wie bei den CD4+ Klonen ergibt, nämlich 0,4095.

Eine weitere Charakterisierung der Oberflächenmarker im Durchflußzytometer ergab, dass 4 der 7 spezifischen Klone aus der CD8+ T-Zell-Linie tatsächlich CD4+ waren. Dies ist durch die Positivselektion der CD8+ T-Zellen über das MACS-System bedingt, das nicht hundertprozentig genau ist; so ließ es sich nicht vermeiden, dass auch in der CD8+ Linie einige CD4+ T-Zellen enthalten waren.

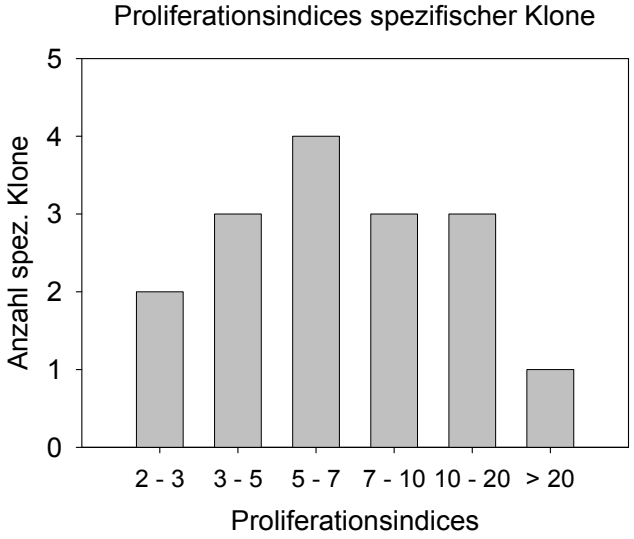


Abb. 4.2-4 Verteilung der PI´s der CD4+ Klone SH (inklusive der 4 CD4+ Klone aus der CD8+ Linie).

Klone wurden als spezifisch gewertet, wenn die Proliferation in Anwesenheit von Nickel während einer 6stündigen Inkubationszeit 48 Stunden nach Ansatz mindestens doppelt so hoch war wie bei der Mediumkontrolle, der PI also ≥ +2 war. Teilt man die Klone nach der Intensität der Teilungsrate auf Nickel in Gruppen ein, so ergibt sich eine Gauß´sche Normalverteilung (vgl. Abb. 4.2-4).

Existenz selbstständiger T-Zell-Klone

Unter den Allergen-spezifischen Klonen befanden sich auch solche, die für eine Allergen-spezifische Proliferation nicht auf Antigen-präsentierende Zellen angewiesen waren. Diese selbstständigen oder autonomen T-Zell-Klone proliferierten auf die alleinige Zugabe von Nickel (vgl. Abb. 4.2-5), während andere Klone nur proliferierten, wenn dem Ansatz zusätzlich APC zugegeben wurden.

27% (3 von 11) der in Koinkubationsexperimenten eingebrachten Nickel-spezifischen Klone waren auf APC angewiesen, also nicht selbstständig, wohingegen sich 73% (8 von 11) als selbstständige Klone erwiesen.

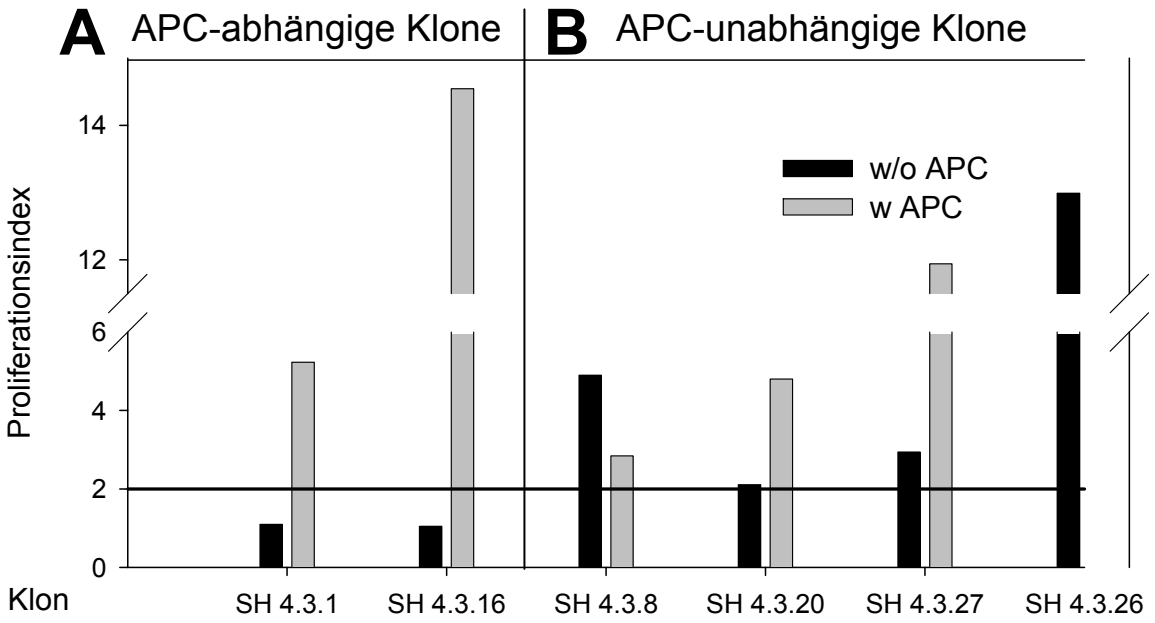


Abb. 4.2-5 Beispiel für die selbstständige Proliferation einiger Klone. Während der PI der Klone SH4.3.1 und 4.3.16 bei alleiniger Zugabe von NiSO4 (schwarze Balken) etwa den Wert 1 annimmt und somit keinen Unterschied der Proliferation ergibt, proliferieren die Klone SH4.3.8, 4.3.20, 4.3.27 und 4.3.26 auch ohne APC signifikant (Signifikanzlinie hervorgehoben). Die grauen Balken stellen den PI in Anwesenheit von APC dar.

Zytokinprofil der einzelnen Klone

Der Überstand der spezifischen T-Zell-Klone wurde 48 Stunden nach Restimulation mit 1% PHA und teilungsunfähigen PBMC als Feederzellen asserviert und auf den Gehalt der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN-γ hin im ELISA untersucht.

Aufgrund der starken Stimulation mit PHA und der daraus resultierenden Produktion auch der PBMC vor allem von IFN-γ wies kein Klon dabei ein eindeutiges Th2- oder Tr1-Zytokinprofil auf (vgl. Tab. 4.2-1). Die relative Verteilung der genannten Zytokine (vgl. Abb. 4.2-6) aber ergab deutliche Unterschiede unter den Klonen, die Rückschlüsse auf den Zelltyp zuließen.

Als T-Zell-Klon vom Typ1 wurde ein Klon definiert, dessen IFN-γ-Produktion relativ zur IL-4- und zur IL-10-Produktion über 95% betrug. War die relative IL-4-Produktion größer als 10%, so wurde der Klon als Typ2-Klon definiert. Klone mit einer deutlich nachweisbaren Produktion aller drei Zytokine wurden als Typ0-Klone bezeichnet (vgl. Abb. 4.2-6).

Nach dieser Definition handelte es sich bei neun Klonen (45%) um Th1-Klone; drei Klone (15%) fielen durch hohe IL-4-Produktion auf und konnten somit dem Th2-Subtyp zugeordnet werden. Die anderen Klone (40%) wurden dem Th0-Typ

zugerechnet, wobei der Klon ID4.19 durch eine sehr hohe Expression von IL-10 auffiel.

Klon/ Zytokin-Muster	Th0	Th1 / Tc1	Th2 /Tc2	Treg
IL-4	→	-	↑	-
IL-10	→	-	→	↑
INF-γ	→	↑	-	-

Tab. 4.2-1 Theoretische Zytokinverteilung der einzelnen T-Zell-Subtypen. „↑“ entspricht einer hohen, „→“ einer geringen und „–“ einer nicht vorhandenen Zytokinproduktion.

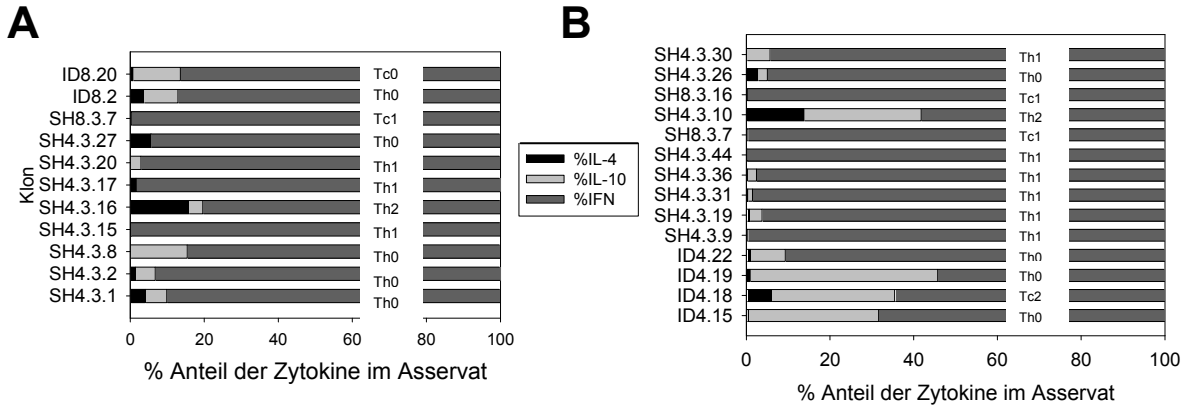


Abb. 4.2-6 Zytokinprofil der in den Koinkubations-Experimenten eingesetzten (A) und der anderen (B) Nickel-spezifischen Klone SH/ID.

Charakterisierung der Oberflächenantigene im Durchflußzytometer

Die für das gewünschte Allergen spezifischen Klone wurden im Durchflußzytometer auf ihren T-Zell-Subtyp hin charakterisiert. Dazu wurden die Klone mit Fluoreszenz-markierten CD3-, CD4- und CD8-Antikörpern inkubiert und anschließend eine eventuelle Antigen-Antikörper-Bindung anhand der Fluoreszenz-Intensität gemessen (vgl. Abb. 4.2-7). Die Klone des Patienten SH wurden dabei in drei Ansätzen parallel mit Negativ- (Isotyp der verwendeten Antikörper), Positivkontrolle (antiCD3) und dem vermuteten Antigen (CD4 bei den Klonen, die aus der Linie mit Positivselektion für CD4 kloniert worden waren und CD8 bei Klonen aus der CD8+ T-Zell-Linie) einfach gefärbt (vgl. Abb. 4.2-7a).

Die Klone des Patienten ID wurden mittels einer Doppelfärbung mit unterschiedlich Fluoreszenz-markierten Antikörpern in einem Ansatz auf die Expression von CD4 und CD8 hin untersucht (vgl. Abb. 4.2-7b).

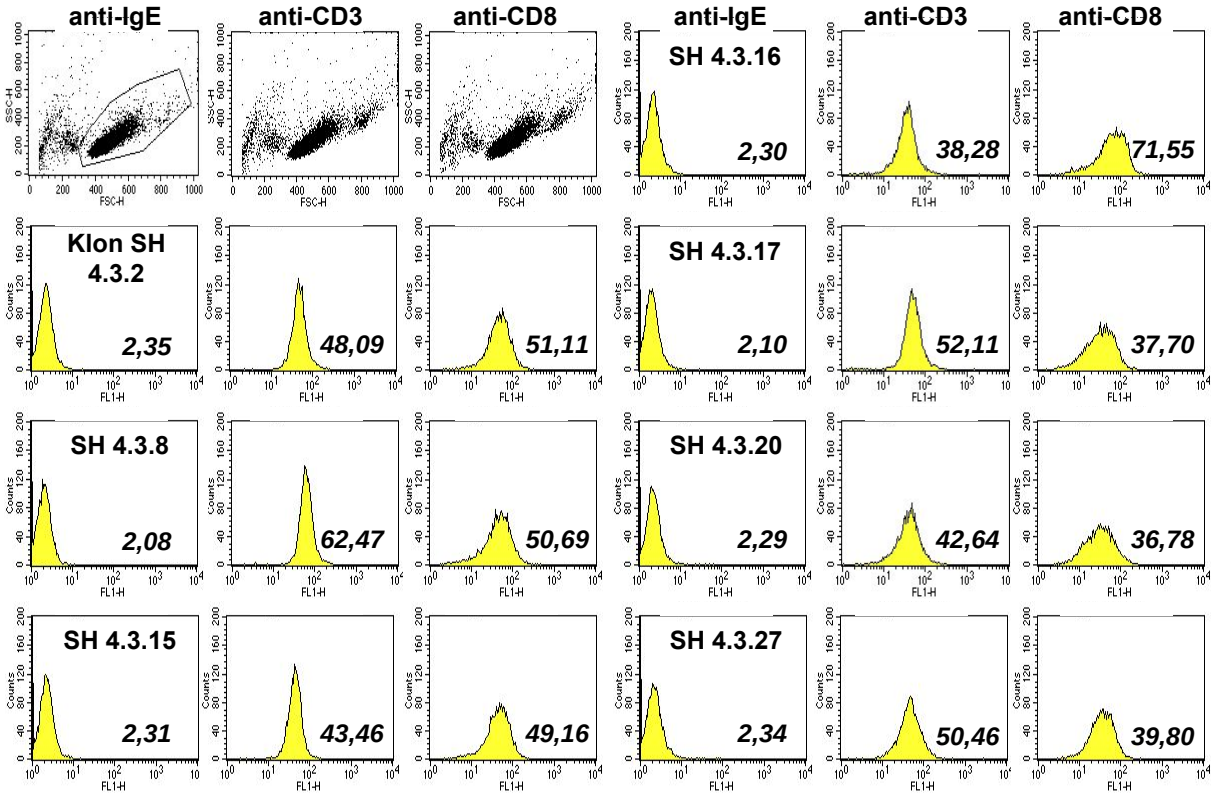


Abb. 4.2-7a. Nachweis der CD4 Oberflächenexpression der Klone SH, die für Koinkubationsansätze verwendet wurden. Die Dot Plots links oben stellen die Morphologie der Zellen sowie die in die Auswertung einbezogenen Zellen (schwarz begrenzte Fläche im Bild links oben) dar, die übrigen Abbildungen zeigen Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensitäten (kursive Zahlenwerte) in Abhängigkeit von der Antikörperbindung.

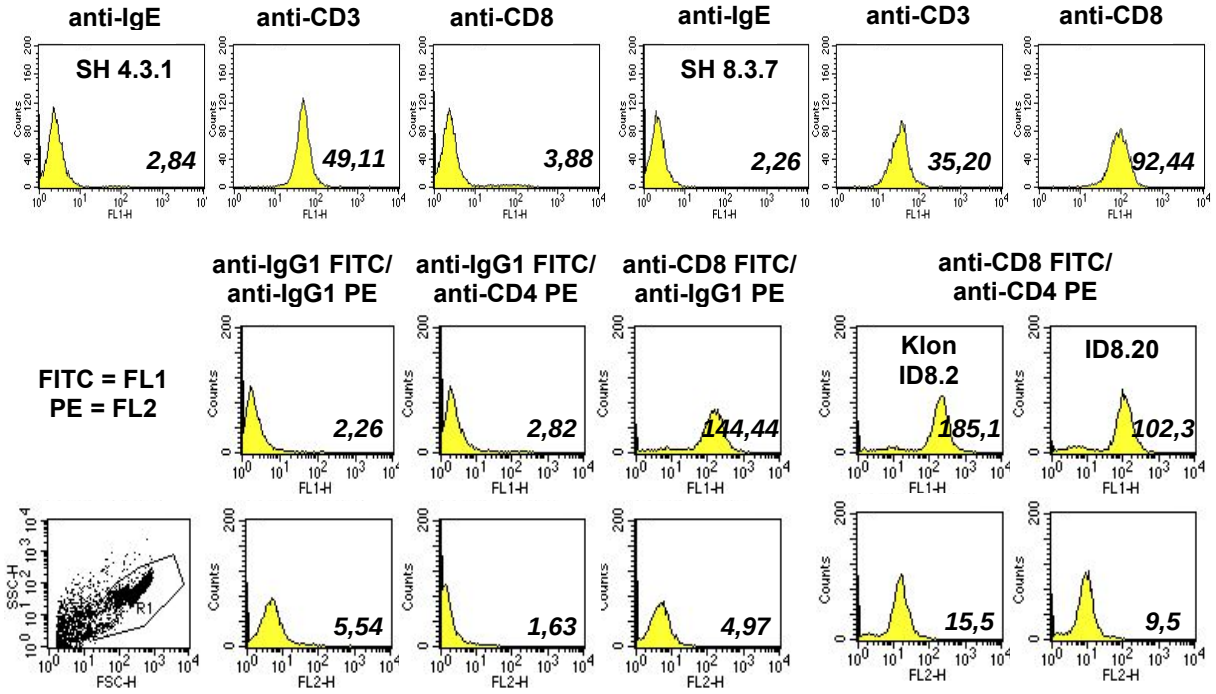


Abb. 4.2-7b. Klone aus der CD8+ T-Zell-Linie, die in Koinkubationsexperimenten eingesetzt wurden. Links unten sind in einem Dot Plot die Morphologie der Zellen sowie die in die Auswertung einbezogenen Zellen (innerhalb der Fläche R1) gezeigt, die anderen Abbildungen zeigen Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensitäten (kursive Zahlenwerte).

Morphologie der Proliferation Allergen-spezifischer T-Zell-Klone

Die Aktivierung und Proliferation der Klone durch ihr spezifisches Allergen wurde lichtmikroskopisch beurteilt. Abbildung 4.2-8 gibt das morphologische Korrelat dieser Reaktion am Beispiel der Klone SH4.3.16 und SH4.3.20 wieder: sowohl im Ansatz mit APC des nicht selbstständigen Klons SH4.3.16 als auch ohne Zugabe von APC beim selbstständigen Klon SH4.3.20 fanden sich bei Zugabe von $NiSO_4$ als Zeichen einer Aktivierung birnenartige, unregelmäßig geformte, wasserklare Zellen mit Neigung zur Haufenbildung („Clusterbildung“), die ohne Zugabe des Allergens nicht zu erkennen waren.

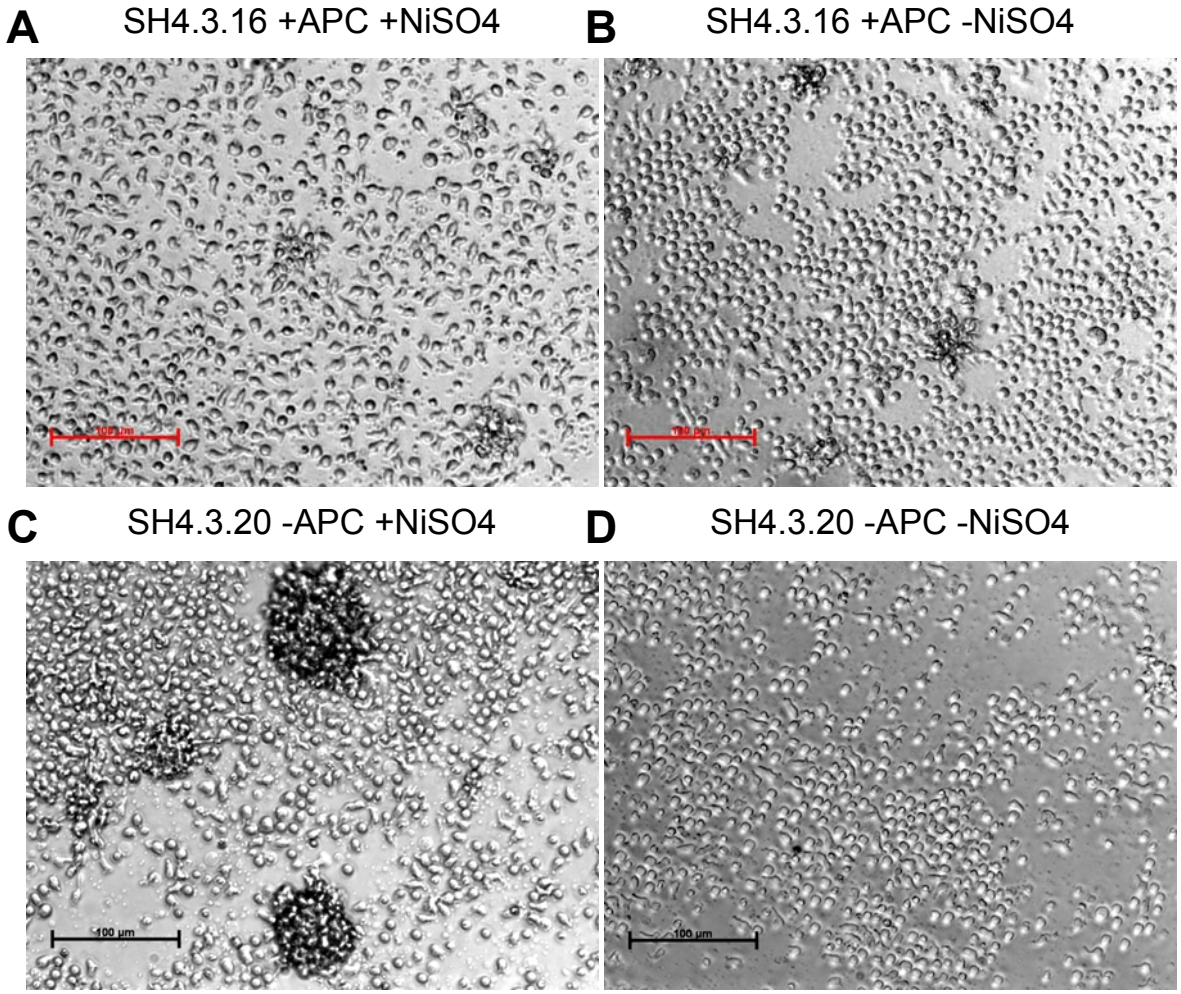


Abb. 4.2-8. Proliferation des Klons SH4.3.16 in Anwesenheit von APC und des selbstständigen Klons SH4.3.20 ohne APC in Abhängigkeit von der Allergenzugabe (A,C: mit $NiSO_4$, B,D: ohne). Die Skalen entsprechen 100µm.

4.2.3 Koinkubation von Allergen-spezifischen T-Zellen und autologen Keratinozyten: morphologisches Bild

Die Interaktion von Allergen-spezifischen T-Zell-Klonen und primären autologen Keratinozyten wurde zunächst morphologisch untersucht. Dabei wurde die Kokultur beider Zelltypen in parallelen Ansätzen sowohl in An- als auch Abwesenheit des Allergens und von APC beurteilt.

Lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie

Abbildung 4.2-9 gibt das lichtmikroskopische Bild einer solchen Koinkubation des Klons SH4.3.20 wieder, der in Anwesenheit von Keratinozyten in seiner Allergen-spezifischen Proliferation gehemmt wird (vgl. 4.2.4).

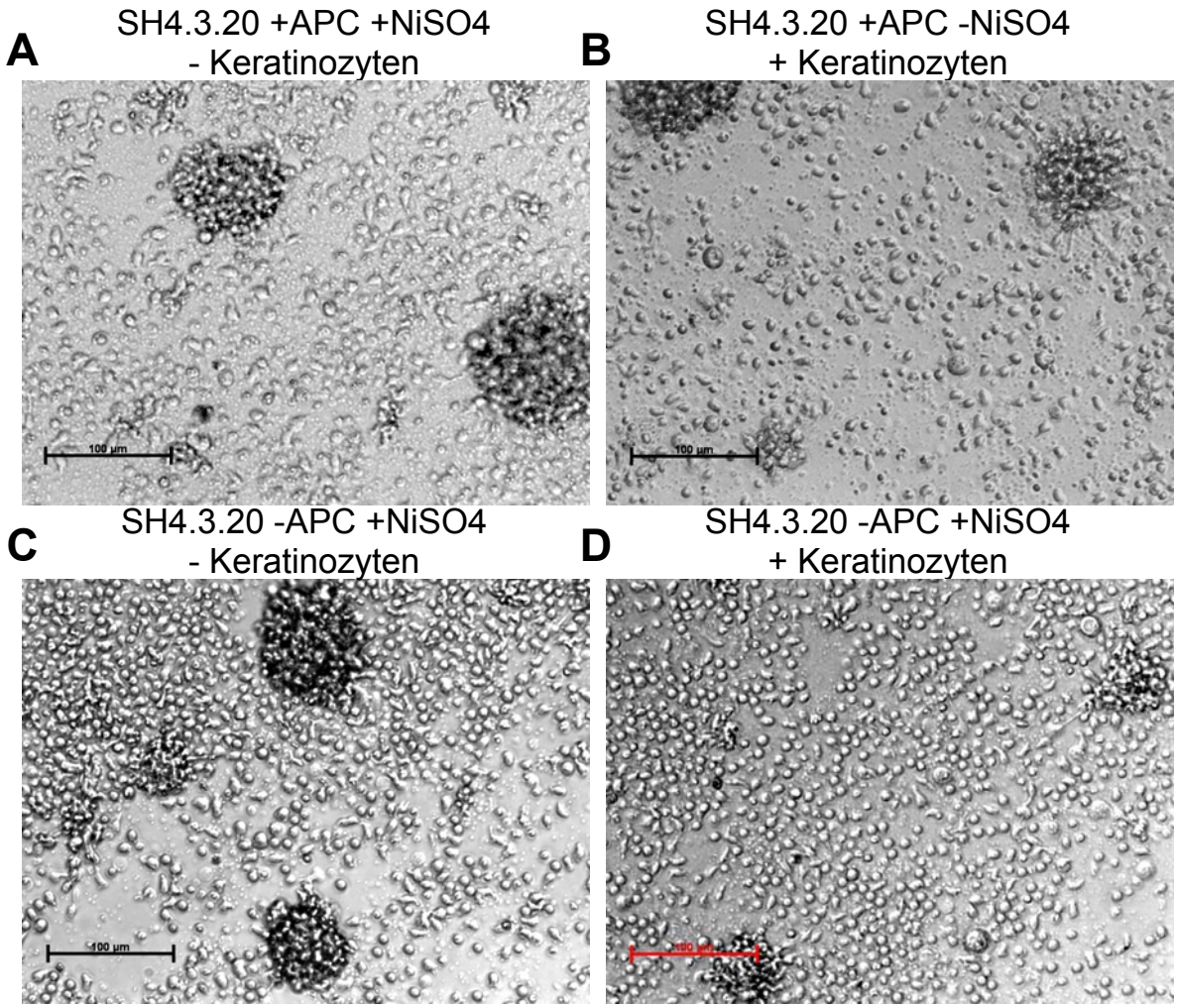


Abb. 4.2-9. Lichtmikroskopische Aufnahme der durch Keratinozyten veränderten Proliferation des Klons SH4.3.20. A,C: Klon ohne Zugabe von Keratinozyten, B,D: Koinkubation beider Zelltypen. Die Skalen entsprechen 100µm.

Dabei fielen deutliche Unterschiede der T-Zell-Proliferation auf: während die T-Zellen in Abwesenheit von Keratinozyten sowohl mit als auch ohne APC (selbstständiger Klon) auf Nickel mit deutlichen morphologischen Zeichen einer Aktivierung und klonalen Expansion (vgl. 4.2.2) reagierten, war ein größerer Teil der T-Zellen in Kokultur mit Keratinozyten (vgl. Abb. 4.2-9B,D) abgerundet und Korrelate einer Aktivierung seltener. Im konkreten Beispiel betrug die Proliferation (gemessen anhand des Thymidin-Einbaus) des Klons in Abwesenheit von APC 41,7%, bei Zugabe von APC 73,6% der Proliferation ohne Keratinozyten-Kokultur.

In allen Kokulturen von Nickel-spezifischen Klonen mit Keratinozyten waren morphologisch enge räumliche Interaktionen beider Zelltypen zu beobachten, sofern die Konditionen für eine Allergen-spezifische Aktivierung der Klone erfüllt waren (Zugabe von Nickel und, bei APC-abhängigen Klonen, von APC). Die teilweise durch Aktivierung verformten T-Zell-Klone gruppierten sich um die Keratinozyten und deren Ausläufer, wie der vergrößerte Ausschnitt der oben gezeigten Kokultur des Klons SH4.3.20 in Abbildung 4.2-10 verdeutlicht.

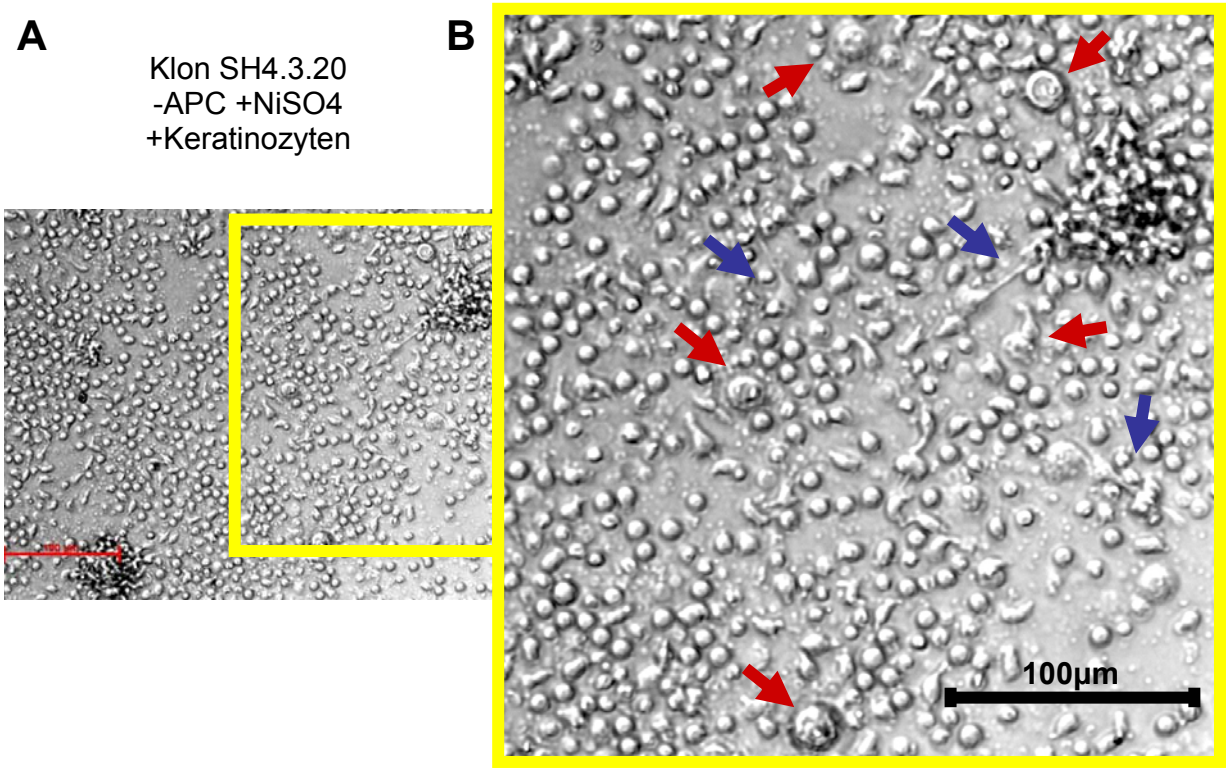


Abb. 4.2-10. Räumliche Interaktionen zwischen T-Zellen und autologen Keratinozyten, die im vergrößerten gelben Ausschnitt aus A (gezeigt in B) durch die roten Pfeile markiert sind. Die blauen Pfeile weisen auf Interaktionen von T-Zellen mit langen Ausläufern der Keratinozyten hin.

Raster-Elektronenmikroskopische Analyse der Koinkubationen

Um eine elektronenmikroskopische Darstellung einer Allergen-abhängigen Zell-Zell-Interaktion von T-Zellen und autologen Keratinozyten zu ermöglichen, wurden in einem ersten Ansatz adhärente Keratinozyten zunächst durch Trypsin-EDTA-Behandlung abgelöst und in einer Suspension für 24 Stunden mit den T-Zellen inkubiert.

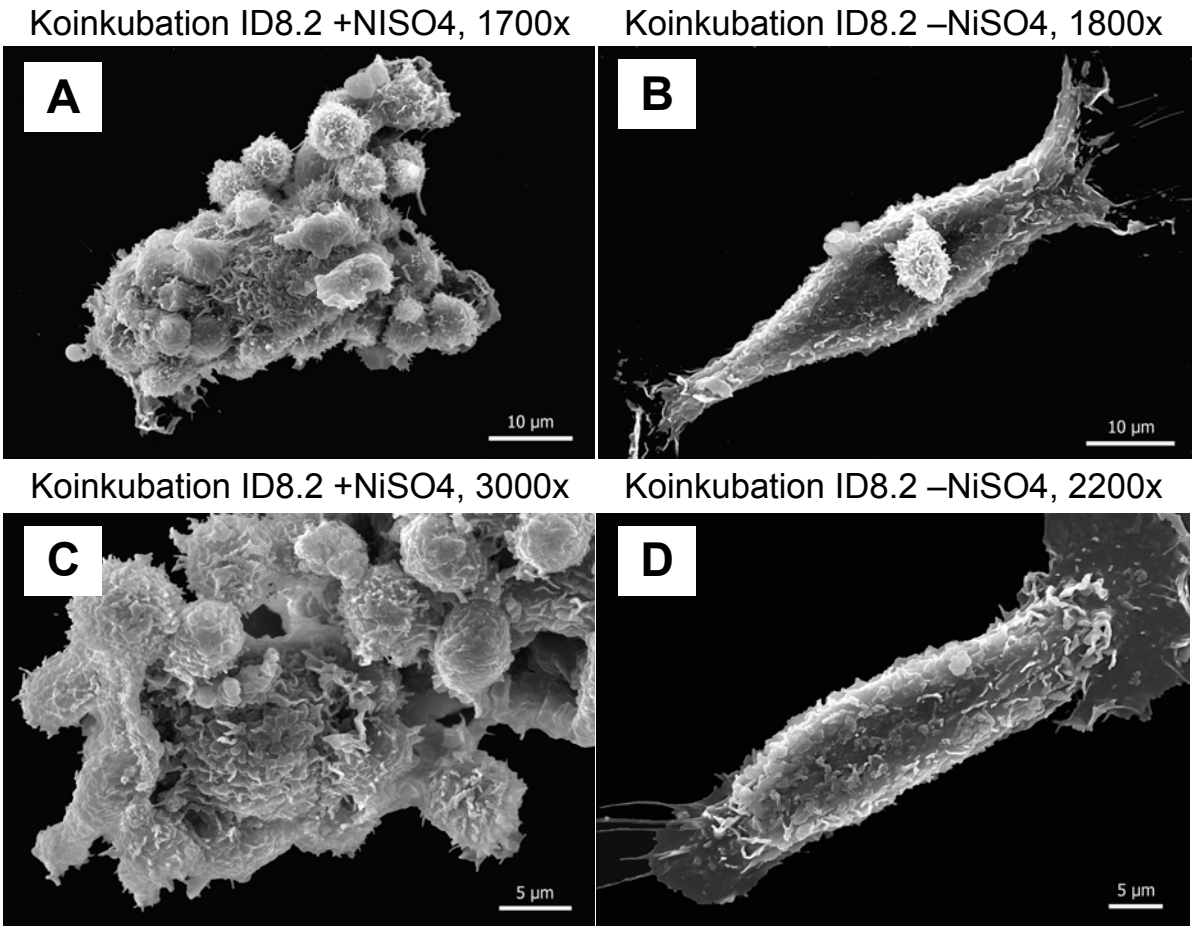


Abb. 4.2-11. Allergen-abhängige Interaktion von T-Zellen und Keratinozyten. A,C: Aufnahmen eines von T-Zellen umsäumten Keratinozyten bei Zugabe von Nickel, B,D: Keratinozyten ohne Nickel-Zugabe.

Durch die verschiedenen Schritte der Fixierung im Vorfeld der Elektronen-mikroskopischen Aufnahme gingen nicht-adhärente Zellen verloren. Somit resultierte eine Darstellung nur der adhärenten Keratinozyten und solcher T-Zellen, die eine relativ stabile Bindung an diese entwickelt hatten. Auf diese Weise war es möglich, die Abhängigkeit der Interaktion beider Zelltypen vom Allergen zu demonstrieren (vgl. Abb. 4.2-11).

Die Keratinozyten, die mit T-Zell-Klonen in Anwesenheit von Nickel koinkubiert waren, kugelten sich ab, was als morphologisches Zeichen von Zell-Stress zu interpretieren ist. Sie waren von T-Zellen belagert, während die Keratinozyten in Kokultur ohne Nickel frei von T-Zellen langgestreckt auf der Oberfläche darstellbar waren.

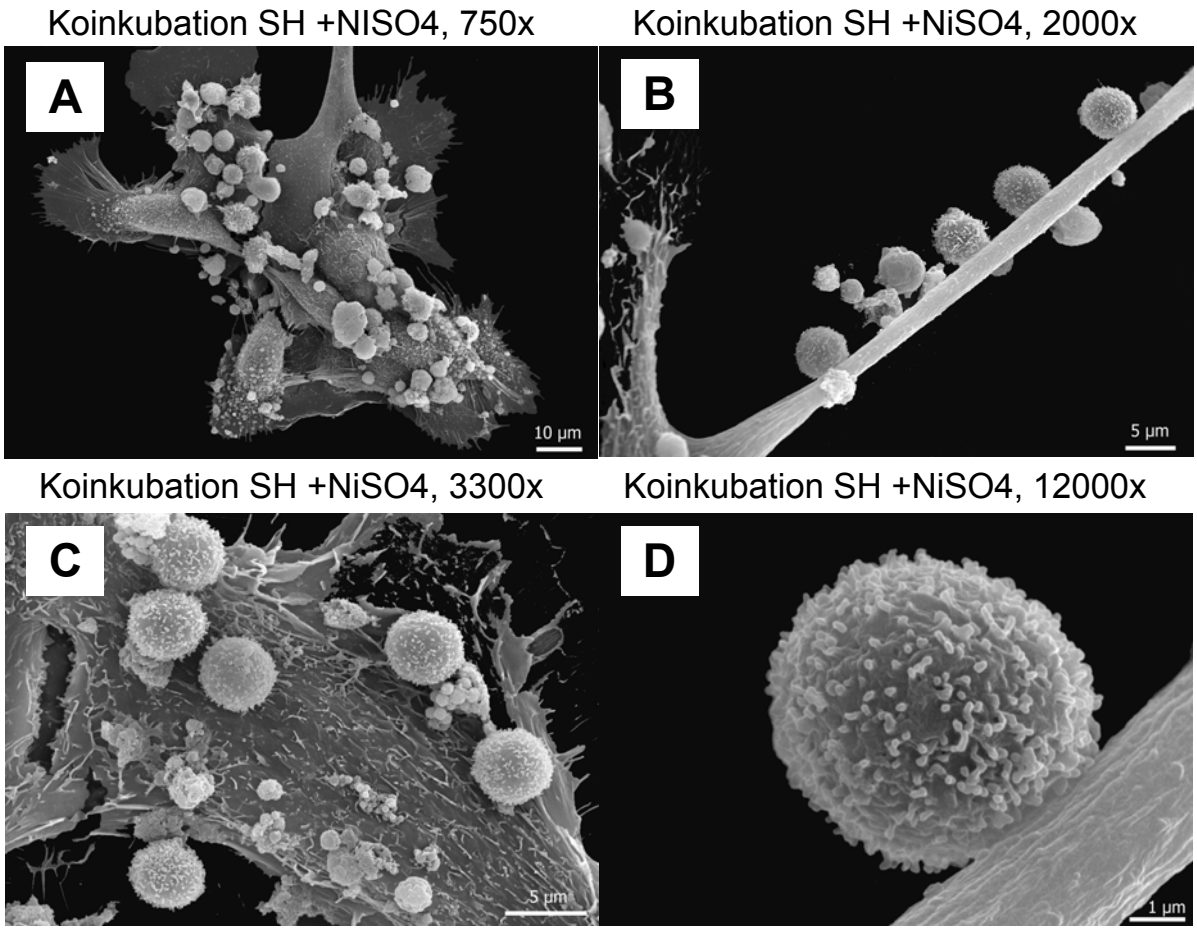


Abb. 4.2-12. Interaktion zwischen dem T-Zell-Klon SH4.3.27 und Keratinozyten (A,C) sowie deren Ausläufern (B,D) in verschiedenen Vergrößerungen (vgl. Skalen).

In einem zweiten Ansatz wurden die T-Zellen für 24 Stunden direkt auf fünf Tage in Kultur befindliche adhärente Keratinozyten gegeben und die Interaktion morphologisch beobachtet (vgl. Abb. 4.2-12). Auch elektronenmikroskopisch fiel die Anlagerung von T-Zellen an lange Ausläufer der Keratinozyten auf, die lichtmikroskopisch in Abbildung 4.2-10 festgehalten ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen Ansätzen, denen Nickel zugegeben wurde und Kontrollen fand sich in diesem Ansatz morphologisch nicht.

4.2.4 Beeinflussung der Proliferation und Aktivierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone durch Keratinozyten

Um den Einfluss von Keratinozyten auf die Proliferationsaktivität von T-Zellen zu analysieren, wurden Proliferationsassays in An- und Abwesenheit von Keratinozyten durchgeführt. Der Einfluss von Keratinozyten wurde wie folgt berechnet:

$$p = (PI \text{ ohne Keratinozyten} / PI \text{ der Kokultur}) \times 100,$$

wobei „PI ohne Keratinozyten“ der Proliferationsindex der Allergenstimulation des T-Zell-Klons ohne Zugabe von Keratinozyten und „PI der Kokultur“ der Proliferationsindex der Allergenstimulation des T-Zell-Klons in Kokultur mit Keratinozyten seien. Der Wert p ergibt die prozentuale Veränderung des PI; ist der Wert kleiner als 100, so werden die T-Zell-Klone in ihrer Proliferation durch die Keratinozyten gehemmt, ist er größer, werden die Klone durch Keratinozyten stimuliert.

Proliferation der Keratinozyten

Die Proliferationsaktivität der Keratinozyten selbst war dabei zu vernachlässigen (vgl. Abb. 4.2-13), da erstens die Zahl der eingesetzten Keratinozyten nur 10% der Zahl der T-Zell-Klone betrug ($10x10^3$/well), und zweitens die Teilungsrate der Keratinozyten um ein Vielfaches länger ist als die der T-Zellen.

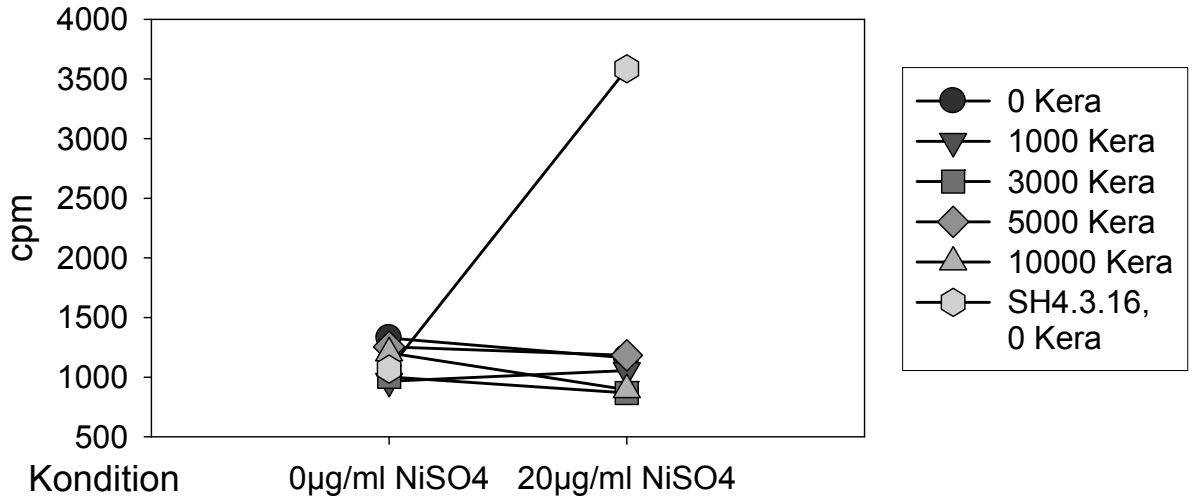


Abb. 4.2-13. Proliferation der Keratinozyten und vergleichend des Klons SH4.3.16 auf Nickel; die Ordinate zeigt die cpm.

Während der kurzen Inkubationszeit mit H_3-Thymidin von sechs Stunden beruhten die erhaltenen cpm zum Großteil auf Einbau des Thymidins in T-Zell-DNA. In Ansätzen von Keratinozyten ohne T-Zellen war der Thymidin-Einbau gering und von der Zugabe von Nickel unabhängig (vgl. Abb. 4.2-13).

Änderung des Proliferationsindex von T-Zellen durch Keratinozyten

Alle getesteten Klone reagierten reproduzierbar auf Keratinozyten; dabei wurden etwa zwei Drittel der Klone (7 von 11) durch die Kokultur mit Keratinozyten gehemmt (vgl. Abb. 4.2-14); zwei Klone wurden stimuliert und ein APC-unabhängiger Klon reagierte bei Zugabe von APC anders als ohne diese.

Die induzierten Klone reagierten dabei wiederholt (n=2-4) mit einem deutlich gesteigerten PI auf die Zugabe von Keratinozyten, wobei sich die Proliferationsaktivität des APC-unabhängigen Klons SH4.3.2 nicht signifikant veränderte, wenn dem Ansatz APC zugegeben wurden; ohne APC proliferierte auch dieser Klon verstärkt in Kokultur mit Keratinozyten.

Der ebenfalls APC-unabhängige Klon ID8.2 wurde bei Inkubation mit APC durch Keratinozyten induziert (n=3), die autonome Proliferation auf Nickel ohne Zugabe von APC jedoch wurde durch Keratinozyten gehemmt (n=2).

Die APC-abhängigen Klone SH4.3.16 (n=5) und SH8.3.7 (n=1), außerdem die APC-unabhängigen Klone SH4.3.15 (n=3), SH4.3.17 (n=3), SH4.3.20 (n=2), SH4.3.27 (n=2) und ID8.20 (n=1) wurden durch Keratinozyten in ihrer Proliferation gehemmt.

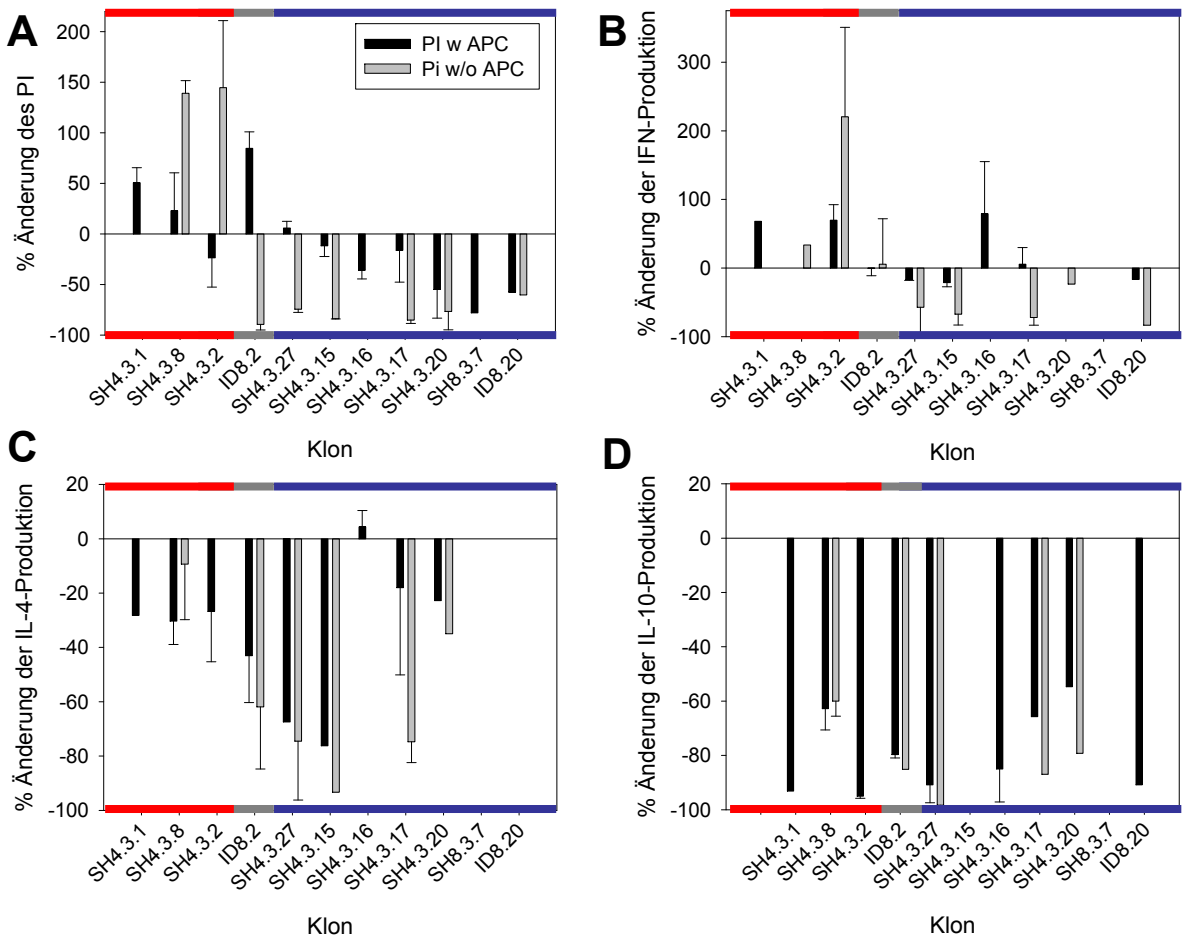


Abb. 4.2-14. Keratinozyten beeinflussen T-Zell-Klone in ihrer Allergen-spezifischen Reaktion. Gezeigt die Veränderung der Proliferation gemessen am Thymidin-Einbau in die Zellen (A) mit der Ordinate des Wertes p, die Veränderung der IFN-γ- (B), IL-4- (C) sowie der IL-10-Produktion (D) jeweils bei Zugabe von APC (schwarz) bzw. ohne diese (grau). Durch Keratinozyten induzierte Klone sind rot, ein uneinheitlicher Klon hellgrau und durch Keratinoyzten gehemmte Klone blau unterlegt.

Veränderung der Zytokinproduktion von T-Zell-Klonen durch Keratinozyten

Die nach 48stündiger Inkubationszeit asservierten Überstände der oben beschriebenen Koinkubationsansätze wurden auf ihren Gehalt an den Zytokinen IFN-γ, IL-4 und IL-10 hin mittels ELISA untersucht.

Dabei fiel auf, dass das proinflammatorische Zytokin IFN-γ bei allen induzierten Klonen in Anwesenheit von Keratinozyten vermehrt exprimiert wurde; dagegen wurde das Zytokin bei einigen gehemmten Klonen geringer (SH4.3.15, SH4.3.17), bei anderen unverändert produziert; von den gehemmten reagierte nur der Klon SH4.3.16 mit einer erhöhten IFN-γ-Produktion auf Keratinozyten-Kokultur (vgl. Abb. 4.2.14).

Das Th2-Zytokin IL-4 wurde bei allen Klonen unabhängig davon, ob sie durch Keratinozyten induziert oder gehemmt wurden, vermindert exprimiert. Nur bei zwei Klonen (SH4.3.8 ohne Zugabe von APC und SH4.3.16) war der Gehalt an IL-4 im Überstand etwa unverändert.

Auch das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 wurde von allen Klonen unabhängig von ihrer Proliferationsveränderung auf Keratinozyten zu einem geringeren Grad ausgeschüttet.

4.2.5 Beeinflussung des Effekts durch unterschiedliche Vorbehandlung und Verwendung heterologer Keratinozyten

Um den beschriebenen Mechanismus der Einflussnahme auf die Proliferation von T-Zellen durch Keratinozyten näher zu charakterisieren, wurden die Keratinozyten auf unterschiedliche Weise vorbehandelt.

Dabei ergab sich, dass eine 24stündige Vorinkubation der Keratinozyten mit 300U IFN-γ weder einen Effekt auf die Veränderung des PI der Klone noch auf die Zytokinproduktion hatte, wie Abbildung 4.2-15a bei einem induzierten (n=3), Abbildung 4.2-15b bei einem gehemmten Klon (n=4) zeigt.

Auch eine längere Kulturzeit der Keratinozyten, die mit einem erhöhten Differenzierungsgrad einhergeht, brachte keine Veränderung der Konstante p (vgl. Abb. 4.2-15a, b) und ebenso wenig der IL-10-Produktion. Getestet wurden elf Tage in Kultur befindliche Keratinozyten im direkten Vergleich zu den wie in den übrigen Ansätzen fünf Tage kultivierten Zellen.

Die Koinkubation von spezifischen T-Zell-Klonen mit heterologen Keratinozyten wurde für vier Klone getestet; davon reagierten drei ohne Veränderung der Konstante p im Vergleich zu autologen Keratinozyten, der Klon SH4.3.16 aber ließ sich durch heterologe Keratinozyten nicht hemmen (vgl. Abb.4.2-15b).

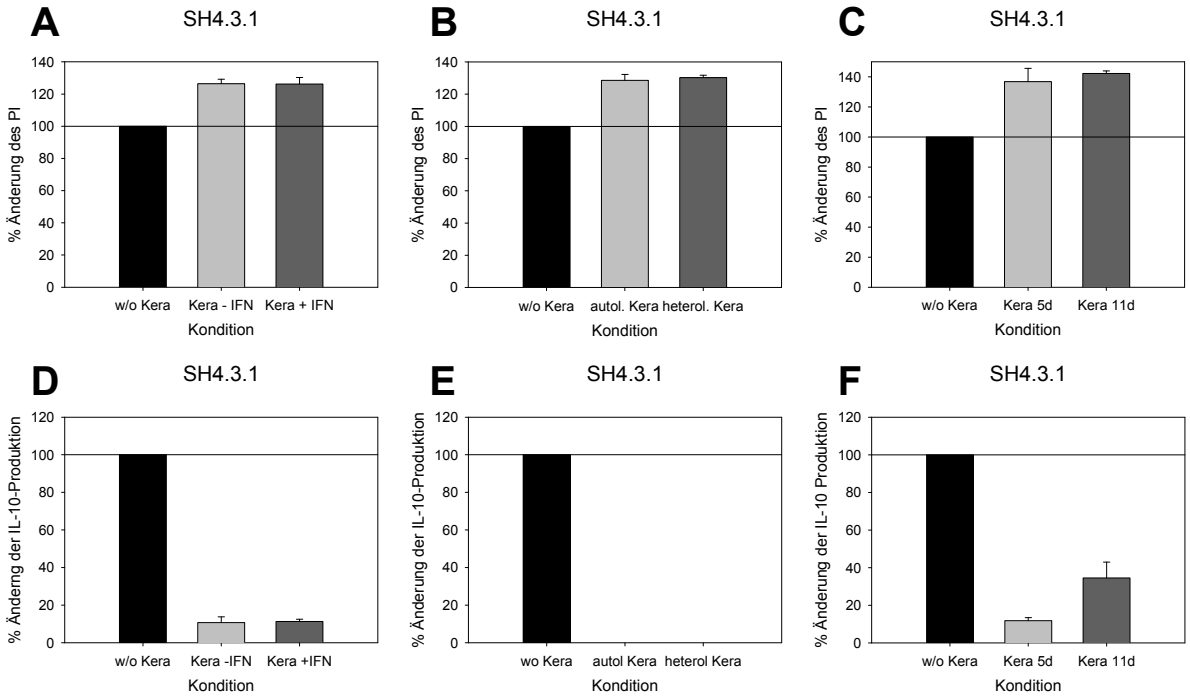


Abb. 4.2-15a. Beeinflussung der Konstante p (gezeigt an der Ordinate, A-C) bzw. der IL-10 Produktion in % (D-F) durch Vorstimulation der Keratinozyten mit IFN-γ (A,D), Verwendung heterologer Keratinozyten (B,E) und unterschiedliche Kulturzeiten (C,F) am Beispiel des induzierten Klons SH4.3.1.

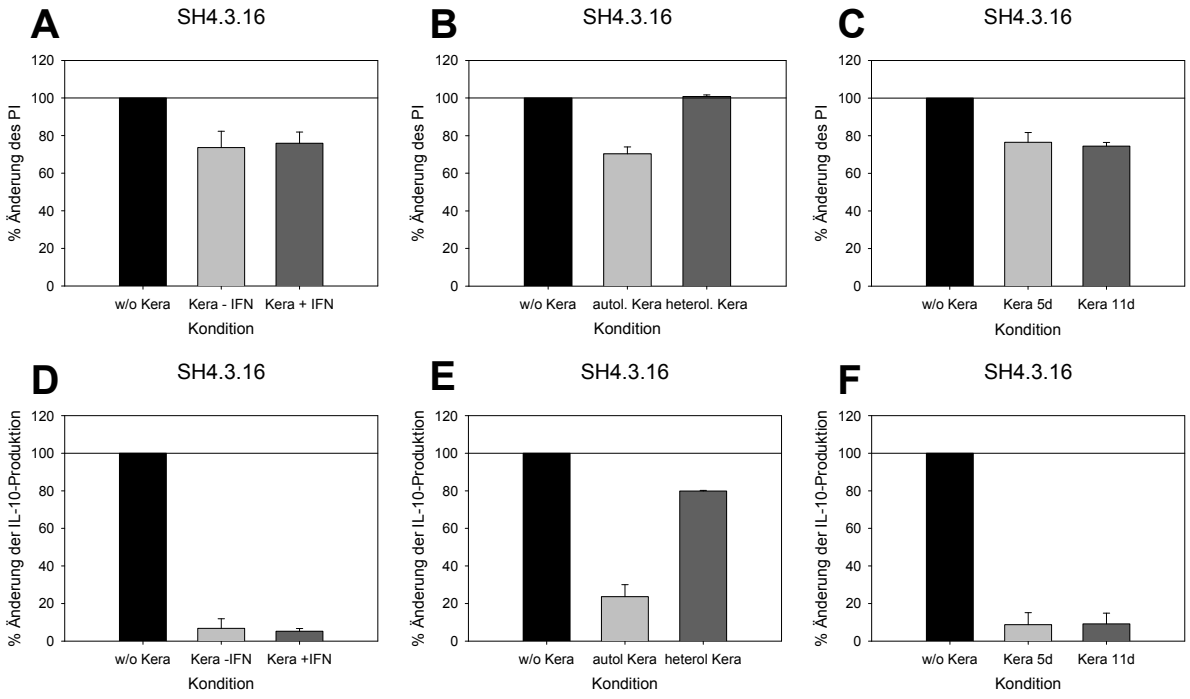


Abb. 4.2-15b. Beeinflussung der Konstante p (gezeigt an der Ordinate, A-C) bzw. der IL-10 Produktion in % (D-F) durch Vorstimulation der Keratinozyten mit IFN-γ (A,D), Verwendung heterologer Keratinozyten (B,E) und unterschiedliche Kulturzeiten (C,F) am Beispiel des gehemmten Klons SH4.3.16.

.

Um festzustellen, ob die den Golgi-Apparat der Zellen blockierende Substanz Brefeldin A (BFA) einen Einfluß auf die Keratinozyten-induzierte Proliferations-Veränderung von T-Zellen nimmt, wurden einige Keratinozyten zwei Stunden mit 50µM BFA vorinkubiert. Ein direkter Effekt von BFA auf die T-Zellen wurde durch intensives Waschen der Keratinozyten nach der Inkubation mit BFA ausgeschlossen. Es zeigte sich dabei eine Tendenz zur Hemmung des beobachteten Effekts. Diese war jedoch nur schwach und nicht signifikant (p=0,15 für SH4.3.20, p=0,25 für SH4.3.27) und in ihrer Ausprägung von Klon zu Klon unterschiedlich (n=2, bei SH4.3.16 n=1) (vgl. Abb. 4.2-15c). So wurde der hemmende Effekt auf den Klon SH4.3.20 praktisch vollständig durch Vorinkubation der Keratinozyten mit BFA aufgehoben, während eine solche Vorinkubation bei Kokultur mit dem Klon SH4.3.27 kaum einen Effekt hatte.
Die IL-10-Produktion veränderte sich analog zu dem Wert p.

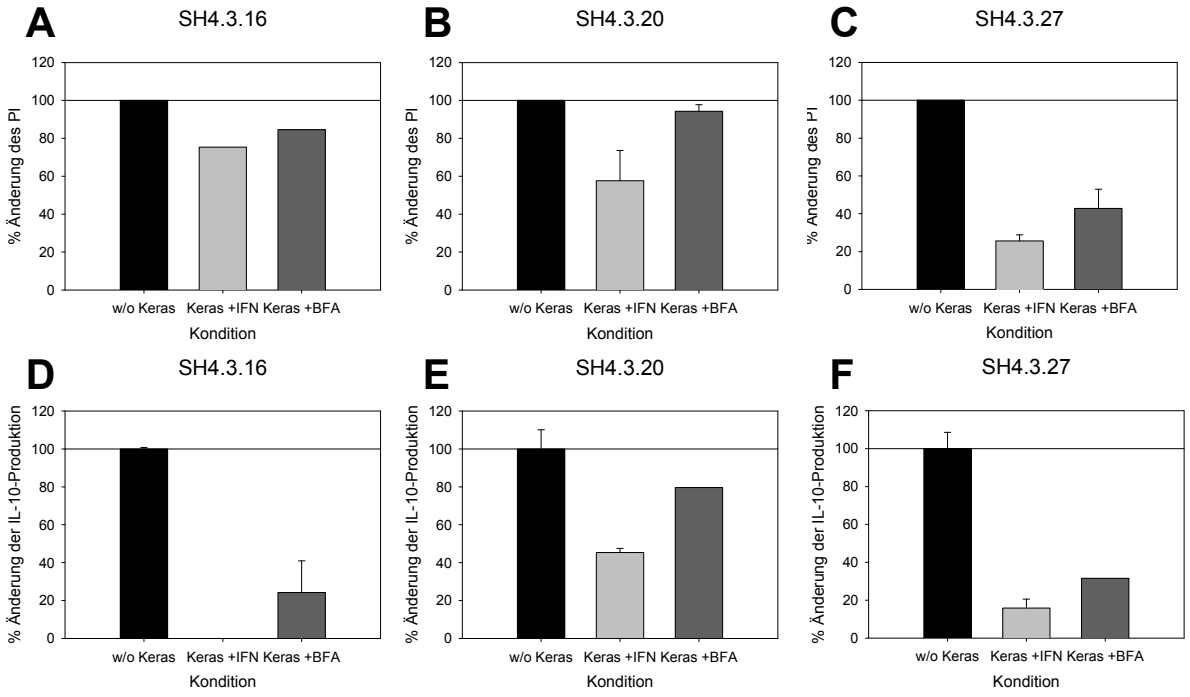


Abb.4.2-15c. Abhängigkeit des PI (A-C) und der IL-10-Produktion (D-F) von der Vorinkubation der Keratinozyten mit BFA am Beispiel der Klone SH4.3.16 (A/D), SH4.3.20 (B/E) und SH4.3.27 (C/F).

5 Diskussion

Während bislang vor allem die Sensibilisierungsphase allergischer Reaktionen im Blickpunkt der Forschung stand, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den immunologischen Hintergründen der klinisch relevanten Effektorphase allergischer Ekzemreaktionen.

Dazu wurden zunächst zwei akute, mittels „Patch Tests“ *in vivo* induzierte Ekzemreaktionen, nämlich die allergische Kontaktdermatitis auf Nickel und die bei einer Subgruppe von Patienten mit atopischem Ekzem auslösbare Ekzemreaktion auf Pollen immunhistochemisch miteinander verglichen. Es zeigte sich hierbei eine prinzipielle Vergleichbarkeit beider Immunantworten, bei denen ein zum größten Teil aus CD4+ T-Gedächtniszellen bestehendes Infiltrat sowie ein Influx von Populationen dendritischer Zellen in Dermis und Epidermis nachgewiesen werden konnten; die Immunreaktion auf Pollen unterschied sich jedoch in vier Punkten von der Kontaktdermatitis: I) Sie folgte einer beschleunigten Kinetik. II) Das Zytokinprofil der einwandernden T-Zellen war in der Frühphase Th2-, im weiteren Verlauf Th1-dominiert, also biphasisch. III) Der Marker für DC-Subpopulationen wie Langerhans-Zellen CD1a war stärker exprimiert. IV) Die Reaktion war begleitet von IgE.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine mögliche immunregulatorische Funktion von Keratinozyten untersucht, indem die Interaktionen von Nickel-spezifischen T-Zell-Klonen und autologen Keratinozyten *in vitro* studiert wurden. Es fand sich eine für jeden Klon konstante Regulation der Allergen-abhängigen Proliferationsaktivität durch homologe Keratinozyten, bei den meisten Klonen im Sinne einer Hemmung, bei einigen jedoch in Form einer Induktion. Unabhängig von der Proliferationsaktivität wurde die Zytokinproduktion der T-Zellen durch Keratinozyten verändert: während IFN-γ uneinheitlich reguliert wurde, wurden die Produktion von IL-4 bei fast allen Klonen und von IL-10 in allen Fällen stark unterdrückt.

Somit ist von einer Regulierung der Ekzemreaktion durch Keratinozyten im Sinne einer I) Selektion von Klonen durch Induktion der Proliferation bestimmter Klone bei gleichzeitiger Inhibierung anderer Klone, einer II) Typ1-Begünstigung der T-Zellen durch Inhibierung der IL-4-Produktion sowie einer III) Unterhaltung der Immunreaktion durch eine Verminderung der IL-10-Produktion von T-Zellen auszugehen.

5.1 Pollen – Aeroallergene als Auslöser einer Ekzemreaktion

Der erste Teil der Arbeit hatte einen Vergleich zweier Immunreaktionen vom zellvermittelten verzögerten Typ (Typ IV nach Coombs und Gell) zum Ziel. Diese überschießende und fehlgeleitete Immunantwort wird klassischerweise auf niedermolekulare Substanzen wie Nickel ausgelöst und ist für solche Haptene in der Literatur mannigfaltig beschrieben. Wenig bekannt dagegen sind die Vorgänge, die in einer Subgruppe von Patienten mit atopischem Ekzem eine akute Ekzemreaktion auf native Pollen auslösen. Diese Reaktion wurde *in vivo* mittels des Atopie Patch Tests, der als Modell der Induktion von akuten Ekzemreaktionen auf Typ I-Allergene anerkannt ist, imitiert.

5.1.1 Klinischer und histologischer Vergleich der Ekzemreaktionen, Kinetik

Pollen lösten bei einer Subgruppe von Patienten mit atopischem Ekzem reproduzierbar von einem lokalen Erythem umgebene Papeln und Vesikel, also eine akute Ekzemreaktion aus. Diese war von der Ekzemreaktion bei der klassischen Typ IV-Reaktion auf Nickel klinisch nicht zu unterscheiden.

Allerdings flammte die Immunreaktion früher auf: während Epikutantests auf Nickel 24 Stunden nach der Allergen-Provokation allenfalls ein leichtes Erythem aufwiesen und der klinische Höhepunkt der Reaktion bei 72 bis 96 Stunden nach Allergen-Provokation lag, war der APT auf Pollen in sensibilisierten Individuen bereits nach 24 Stunden positiv, nach 48 bis 72 Stunden war die Immunreaktion am stärksten ausgeprägt; 96 Stunden nach Provokationsbeginn war klinisch keine Reaktion mehr nachweisbar. Der Zeitverlauf des APT auf Pollen entspricht den in der Literatur für andere Aero-Allergene wie dem Hausstaub angegebenen zeitlichen Dimensionen [82,134], wenngleich keine Arbeit beschrieben ist, die die Kinetik der Reaktionen über so viele Zeitpunkte untersucht hat wie die vorliegende.
Auch die im Vergleich zum APT verzögert einsetzende Crescendo-Reaktion des NPT lässt sich mit vorhandenen Ergebnissen in der Literatur in Einklang bringen [59,137].

Die Immunreaktion auf native Pollen beruhte dabei zumindest teilweise auf Allergen-spezifischen Mechanismen, da auch innerhalb der Positiv-Gruppe (Gruppe I) die Reaktionsmuster auf Pollen interindividuell unterschiedlich waren: so reagierte der Patient „MP“ nur auf Birkenpollen (Betula alba), nicht jedoch auf Gräserpollen (Phleum pratense) mit einer Ekzemreaktion, während der Patient „WG“ genau umgekehrt reagierte. Diese Reaktionsmuster entsprachen den jeweiligen Typ I-Sensibilisierungen der Probanden: „MP“ war RAST-Klasse 5 positiv für Betula und 3 für Phleum, WG RAST-Klasse 6 für Phleum und 0 für Betula. Eine rein irritative Reaktion etwa durch aus Pollen freigesetzte Proteasen kann durch diese Konstellation ausgeschlossen werden.

Histologisch lagen den induzierten Ekzemreaktionen eine Infiltration mononukleärer Zellen und ausgeprägte Zeichen von Zellschaden in der Epidermis, wie Verlust des Zellverbandes der Keratinozyten (Spongiose und Akantholyse) mit nachfolgendem interzellulärem Ödem, zugrunde. In Gebieten starker Hautschädigung war ein Epidermotropismus des entzündungszellulären mononukleären Infiltrates nachweisbar. Diesbezüglich waren die Biopsien der Gruppen I und II histologisch nicht voneinander zu unterscheiden.
In Biopsien der Gruppe III wurde ein sehr geringes mononukleäres Infiltrat in der Dermis ohne Epidermotropismus nachgewiesen, histologische Zeichen von Zellschaden in der Epidermis fanden sich nicht.

5.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung des proinflammatorischen mononukleären Infiltrates

Die zelluläre Zusammensetzung des Infiltrates beider allergischen Reaktionen (sowohl gegen Pollen als auch gegen Nickel) wurde immunhistochemisch untersucht und miteinander sowie gegen die Negativkontrollen unter Zuhilfenahme eines Software-Programmes, das eine Quantifizierung von Flächen anhand verschiedener Farbintensitäten ermöglicht, verglichen. Dabei fielen kaum qualitative Unterschiede zwischen dem APT und dem NPT auf; die maximale Intensität der Reaktion, die sich in der Masse einwandernder mononukleärer Zellen widerspiegelt, war beim NPT

gleichwohl größer als beim APT, was im Falle von CD3 signifikant war (p = 0,046 nach 72 Stunden, p = 0,008 nach 96 Stunden).

Bei der überwiegenden Mehrheit der einwandernden Zellen handelte es sich um T-Zellen (CD3+) der CD4+ Subpopulation; über den gesamten Zeitverlauf gemittelt gehörten nur etwa 10% der Zellen dem Subtyp CD8+ an. Diese Ratio entspricht etwa der Relation Allergen-spezifischer T-Zellen in von Ekzemreaktionen betroffener Haut [153].
Die CD8+ T-Zellen spielten im NPT aber eine zeitabhängig wachsende Rolle: so stieg deren Zahl im Unterschied zu den anderen proinflammatorischen Parametern kontinuierlich an und war nach 72 und 96 Stunden signifikant größer als beim APT. Damit ist zu erklären, warum eine Studie, die nur den Zeitpunkt 72 Stunden nach Allergenprovokation untersuchte, zu einer Verteilung von zwei Dritteln CD4+ und einem Drittel CD8+ T-Zellen kommt [13]. Die Bedeutung dieses Anstieges ist möglicherweise durch die Tatsache zu erklären, dass CD8+ T-Zellen die Haupt-Effektorzellen in der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel sind [140], die erst 72 bis 96 Stunden nach Allergen-Provokation ihren Höhepunkt erreicht.

Die bei weitem überwiegende Mehrheit der T-Zellen exprimierte den Marker CD45RO. Fast alle einwandernden T-Zellen hatten also im Laufe ihres Lebenszyklus schon Antigenkontakt gehabt und waren zu T-Gedächtniszellen ausgereift. Dieser Befund passt zu dem gängigen Konzept des biphasischen Verlaufs der allergischen Ekzemreaktion, nach dem während der Sensibilisierungsphase zu Gedächtniszellen differenzierte ursprünglich naive T-Zellen in der Effektorphase in die Haut einwandern [50,115].

Knapp 20% aller infiltrierenden Zellen waren darüber hinaus CD25 positiv. CD25, die α-Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors, ist ein Marker für aktivierte T-Lymphozyten, der allerdings auch als wichtiger Differenzierungsparameter für T-regulatorische Zellen gilt. Diese Population folgte einer im Vergleich zu den anderen Zell-Typen etwas verzögerten Kinetik: so waren im APT nach 72 Stunden, im NPT nach 96 Stunden die meisten CD25+ Zellen zu beobachten, während in den Frühstadien der Reaktion deutlich weniger Zellen für CD25 positiv waren. Im Falle der Reaktion auf Nickel wurde dieses verzögerte Erscheinen bereits beschrieben [13].

Ob es sich bei den Zellen aber um aktivierte Effektor- oder inhibierende Modulator-Zellen handelte, konnte wegen des Fehlens eindeutiger Marker für T-regulatorische Zellen nicht zweifelsfrei geklärt werden. Da gleichwohl eine Bedeutung der inhibierenden regulatorischen T-Zellen sowohl im atopischen Ekzem [145] als auch in der allergischen Kontaktdermatitis [26] beschrieben ist, ist von einer Mischpopulation aus aktivierten T-Zellen und T-regulatorischen Zellen, die möglicherweise zeitversetzt in die Haut einwandern, auszugehen.
CD25 wird ebenfalls sowohl auf humanen [147] als auch auf murinen DC [32] exprimiert. Es ist somit möglich, dass besonders der frühe Anstieg der CD25+ Zellen zum Teil auf DC zurückgeführt werden kann. Dies könnte nur durch eine Doppelfärbung ausgeschlossen werden.

5.1.3 Das Zytokin-Profil der infiltrierenden T-Zellen

Die Bedeutung von Typ 1- und Typ 2-T-Zellen bei der Entstehung und Unterhaltung der entzündlichen Ekzemreaktion wurde durch die Bestimmung der Zytokine IFN-γ (Typ 1) und IL-5 (Typ 2) abgeschätzt. Die Bildung des Quotienten t aus beiden Zytokinen gab dabei Aufschluss über die Gewichtung des Profils der Immunantwort. Dabei wurde aus methodischen Gründen IL-5 und nicht IL-4 bestimmt.
Es ist bekannt, dass der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel eine Typ 1-vermittelte Immunantwort zugrunde liegt. Die Beobachtung, dass der Quotient t in den untersuchten positiven NPT-Biopsien zu allen Zeitpunkten deutlich größer als 1 war und somit die IL-5-produzierenden Zellen im Vergleich zu den IFN-γ-produzierenden Zellen eine untergeordnete Rolle spielten, steht mit diesem Postulat in Einklang.

Dagegen wird die Entstehung eines Ekzems bei Atopikern als biphasische Reaktion verstanden, die in der Frühphase Th2-vermittelt ist und im weiteren Verlauf in eine Th1-dominierte Immunantwort übergeht. Dies wurde sowohl im Maus-Modell [126] als auch für APT-Reaktionen auf Hausstaub beschrieben: waren diese nach 24 Stunden durch eine hohe IL-4-Produktion geprägt, überwog bereits nach 48 Stunden die Expression von IFN-γ auf mRNA-Ebene [56], zeitlich etwas verzögert war auch immunhistochemisch eine Dominanz dieses Zytokins nachweisbar [136].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten beschreiben ebenfalls ein initiales (24 Stunden nach Allergenprovokation) Überwiegen des Typ 2-Armes der T-Zell-Immunantwort auf Pollen; hielten sich beide repräsentativen Zytokine nach 48 und 72 Stunden noch die Waage, so war nach 96 Stunden eine Typ 1-dominierte Reaktion festzustellen. Auch beim APT auf Pollen ist demnach eine biphasische Immunreaktion Grundlage der Ekzem-Entstehung und -Unterhaltung.

5.1.4 Die Allergen-Präsentation im Entzündungsgebiet

Neben professionellen APC wie Inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) wandern auch Vertreter des Monozyten-Makrophagen-Systems in Entzündungsgebiete der Haut ein.
Die Untersuchung der Marker CD64 und CD68 als Differenzierungs-Parameter für Zellen des innaten Immunsystems ergab einen deutlichen Anstieg der Zelltypen sowohl im APT als auch im NPT bis 72 Stunden nach Allergenprovokation. Die klassische Unterscheidung zwischen Makrophagen und DC ist durch die Beobachtung von CD1a+/CD68+ Mischpopulationen ins Wanken geraten; Monozyten und Makrophagen werden nun als Vorläuferzellen von professionellen APC diskutiert [77]. Somit kann die beobachtete Infiltration von Monozyten und Makrophagen als Quelle von DC interpretiert werden, die lokal im proinflammatorischen Milieu ausdifferenzieren.

In Kongruenz zu dieser Theorie wurde bis 72 Stunden nach Applikation des Allergens ein kontinuierlicher Anstieg CD1a-exprimierender DC in Dermis und Epidermis beobachtet; es kam also bei beiden verglichenen Immunantworten zu einer Rekrutierung von DC aus dem Blut- und Lymphsystem und darüber hinaus eventuell zu einer lokalen Ausdifferenzierung aus Monozyten und Makrophagen.
Dabei war die Menge CD1a+ Zellen im APT bis zum Abklingen der Immunreaktion nach 96 Stunden größer als im NPT. Die Ursache für diese vermehrte Expression im APT könnte ihren Ursprung in der Natur des Pollen haben, der weit mehr als nur einen Allergen-Träger darstellt [142]. So könnten die bei Auftreffen auf die Haut freigesetzten proinflammatorischen bioaktiven Lipid-Mediatoren („PALM´s“), [75,141] zu einer Rekrutierung von DC und Hochregulierung von CD1a auf diesen Zellen

führen und Lipid-Antigene aus dem Pollen über CD1-Moleküle von APC präsentiert werden [3].

Für einen weiteren Subtyp dendritischer Zellen, die inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC), konnte ein starker Influx in Dermis und Epidermis in den Biopsien der Gruppen I und II nachgewiesen werden. Die besonders auf IDEC stark exprimierten Marker FcεRI [148] und CD1b wurden dabei in APT-Biopsien früher und in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Auch nach 96 Stunden waren, besonders im Falle von FcεRI, noch große Mengen dieser Antikörper nachweisbar.
Sowohl der festgestellte frühe Influx als auch die prolongierte Reaktion im APT stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Verhalten von IDEC im atopischen Ekzem überein [76].

Im Unterschied zu Langerhans-Zellen und IDEC konnte bei der dritten untersuchten DC-Population, den plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) keine verstärkte Expression im APT nachgewiesen werden. Der Marker BDCA-2 folgte vielmehr der Kinetik des mononukleären Infiltrates: so wurden in der Frühphase der Reaktion mehr dermale pDC im APT, nach 72 Stunden und insgesamt jedoch mehr pDC im NPT beobachtet. In der Epidermis war die Zahl der pDC sehr gering, es konnten keine Unterschiede ausgemacht werden.
Diese letzte Beobachtung steht im Widerspruch zu einer Arbeit über das atopische Ekzem, in der eine Verminderung von pDC in der Epidermis beschrieben wurde [155]. Da eine Funktion der pDC die Erkennung viraler Erbsubstanz zu sein scheint [30], wurde eine erhöhte Anfälligkeit der Atopiker gegenüber viralen Erkrankungen mit dieser Verminderung erklärt. Neuere Daten scheinen allerdings eher auf eine gestörte Funktion als eine Dezimierung der pDC im atopischen Ekzem aufgrund von Beladung mit IgE zu deuten; so induzierten derartige pDC in Allergen-spezifischen T-Zell-Klonen eine Th2-Immundeviation, die Produktion der antiviralen Zytokine IFN-α und -β war erniedrigt [101].

Atopiker zeigen häufig einen erhöhten Serum-IgE-Spiegel [29]. Dabei scheint der Schweregrad entzündlicher Hautreaktionen bei Patienten mit atopischem Ekzem positiv mit einem erhöhten IgE-Spiegel im peripheren Blut zu korrelieren [92]; im

Gegensatz dazu sind diese Antikörper bei Nickelallergikern in der Regel nicht vermehrt exprimiert [29].
Dazu passt die Beobachtung, dass keine IgE-Antikörper in den Biopsien des NPT nachweisbar waren. Bei Biopsien des APT dagegen konnten diese Antikörper in großen Konzentrationen in Dermis und Epidermis beobachtet werden: der Höhepunkt der Reaktion lag bei 24 Stunden nach Allergen-Provokation und fiel im weiteren Verlauf nur langsam ab.
Auch in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von AE-Patienten war IgE, wenngleich in deutlich niedrigeren Konzentrationen, nachweisbar.

5.1.5 Das Bild der negativen Patchtests und der chronischen Läsion

Ein klinisch blandes Testgebiet bei Patienten der Gruppe drei ging einher mit einem Gehalt an T-Zellen in den Biopsien, der mit den Werten von klinisch unauffälliger, nicht provozierter Haut vergleichbar war; es hatte also keine oder nur eine äußerst geringe Infiltration dieser Zellen in Dermis und Epidermis stattgefunden. Diese Beobachtung steht im Einklang zu veröffentlichten Studien [83].

Dagegen fiel eine geringfügig über den basalen Wert erhöhte Expression der Marker der Allergen-Präsentation auf; sowohl die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems als auch CD1a+ APC waren im Vergleich zu dem Wert der normalen Haut teilweise leicht vermehrt nachweisbar. Ob diese Tatsache den Schluss zulässt, dass eine geringe Menge des Allergens auch in klinisch unauffälligen Provokationsgebieten die Hautbarriere durchdringt und von APC präsentiert wird, ist jedoch fraglich; hierzu wäre ein direkter Allergen-Nachweis in den gewonnenen Biopsien vonnöten.

IgE-Antikörper waren sowohl in normaler Haut als auch in Biopsien Allergen-provozierter Gebiete bei Haut-gesunden Probanden nicht nachweisbar; in allen Biopsien von Patienten mit atopischem Ekzem der Gruppe drei konnten aber geringe Konzentrationen des Antikörpers nachgewiesen werden. Nur in diesem Punkt unterschieden sich innerhalb der Gruppe III die Biopsien von Ekzempatienten von denen gesunder Probanden.

Das klinische Bild der chronischen atopischen Ekzem-Läsion war in deutlich geringerem Maße von ödematösen Erythemen und Pusteln geprägt als die akute Form. Hier standen klinisch eine verdickte, lichenifizierte Haut und Exkoriationen im Vordergrund.
Histologisch spiegelte sich diese klinische Erscheinungsform in einer stark verbreiterten Epidermis und einem geringeren mononukleären Infiltrat wider, das gleichwohl deutlich über dem Wert klinisch unauffälliger Haut lag. Die Zusammensetzung des Infiltrates war nach immunhistochemischer Aufarbeitung der Biopsien identisch zu dem der akuten Ekzem-Läsionen.
Auffällig war eine starke Expression von CD1a, auch die Marker für IDEC, CD1b und FcεRI, waren im Vergleich zu gesunder Haut leicht vermehrt exprimiert. Die anderen Parameter der Allergenpräsentation bewegten sich auf dem Niveau normaler Haut.

Der Quotient t war größer als 1, somit sind die Typ 1-T-Zellen im chronischen Ekzem vorherrschend. Dieses Ergebnis deckt sich mit der vorhandenen Literatur [56,136].

Das klinische, histologische und immunhistochemische Bild der chronischen Ekzem-Läsion standen mit dem in der Literatur beschriebenen in Einklang [105].

5.1.6 Ein Konzept zur Effektorphase des Pollen-induzierten Ekzems

Der Vergleich der Pollen-induzierten akuten Ekzemreaktion mit der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel macht folgende Unterschiede deutlich: die Reaktion auf Pollen folgt einer beschleunigten Kinetik, das Zytokinprofil der infiltrierenden T-Zellen ist biphasisch, der Marker für die DC-Subpopulation Langerhans-Zellen CD1a ist stärker exprimiert und die Immunreaktion ist zumindest begleitet von IgE und einer hohen Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors.

Die Kombination dieser Unterschiede mit den immunhistochemischen Befunden einer klassischen Typ IV-Reaktion lässt folgende Hypothese einer dreigeteilten Effektorphase der Ekzemreaktion auf nativen Pollen zu (vgl. Abb. 5.1-1).

Im ersten Teil der Reaktion, der Sofort-Reaktion, die innerhalb von Minuten und wenigen Stunden eintritt, treffen Pollen auf die Haut bereits sensibilisierter Individuen und setzen ein Arsenal proinflammatorisch wirkender Substanzen frei, die durch die gestörte Hautbarriere dringen und somit proinflammatorisch wirken können. In diesem entzündlichen Milieu, zu dem auch die abnorm reagierenden Keratinozyten von Atopikern etwa durch eine erhöhte Expression des Entzündungs-Transkriptionsfaktors AP-1 und eine verminderte Produktion des anti-inflammatorischen IL-10-Rezeptors beitragen, werden die Allergene in der Haut durch lokale FcεRI-exprimierende APC und IgE-Antikörper gebunden und lokal wie im regionalen Lymphknoten präsentiert; es kommt zu einer Degranulation dermaler Mast-Zellen durch Verschmelzung Allergen-beladener IgE-Antikörper auf deren Membran und damit zur Ausschüttung weiterer entzündungsfördernder Substanzen wie Proteasen und vasoaktiver Amine (Histamin) einerseits und einer MHC-restringierten Allergenpräsentation von Pollen-Protein und möglicherweise von Pollen-Lipiden über CD1 [3] durch APC andererseits.

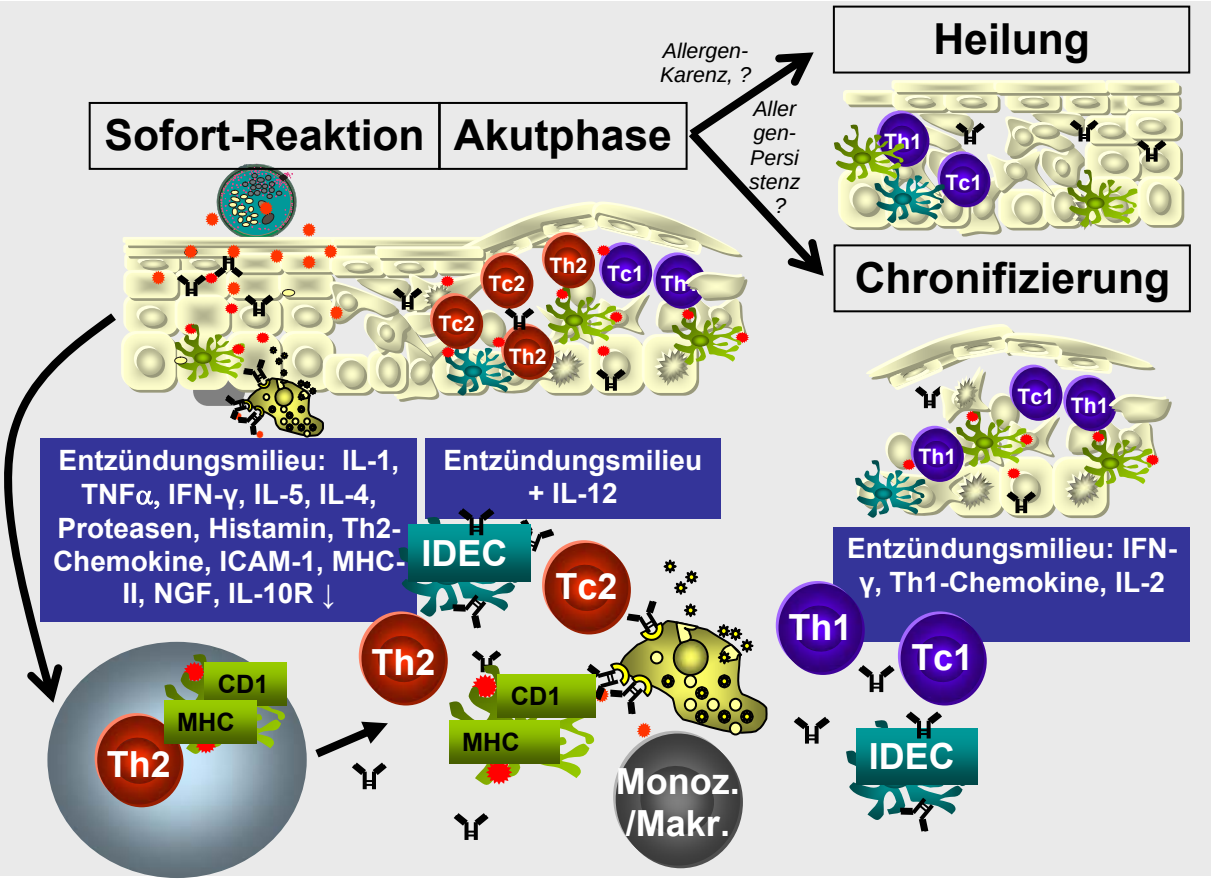


Abb. 5.1-1. Darstellung der dreigeteilten Effektorphase der Ekzemreaktion auf Pollen.

Diese Frühform der Entzündung ist dabei durch die Beteiligung von IgE und IL-5-produzierenden Mastzellen primär Th2-vermittelt; entsprechend kommt es in der zweiten Phase der Ekzementstehung, der Akutphase, innerhalb von 24 Stunden nach Allergen-Provokation zur Infiltration von Typ2-T-Zellen, Monozyten und Makrophagen als Resourcen für die Differenzierung professioneller APC, von DC-Populationen wie den IDEC und von Eosinophilen Granulozyten.

Die dritte Phase der Ekzemreaktion spielt sich etwa ab 48 Stunden nach Allergen-Provokation ab. Sie sich kann entweder in der Limitierung der Reaktion und damit, wie im verwendeten System der Patch Tests, der klinischen Heilung oder aber in einer Chronifizierung äußern.
Die Faktoren, die den Verlauf dieser Immunantwort bestimmen, sind unklar. In dieser Arbeit wird ein möglicher regulatorischer Effekt von Keratinozyten untersucht. Zumindest einen Einfluss dürfte auch die Allergen-Persistenz oder -Karenz haben. Welche weiteren Mechanismen darüber entscheiden, ob eine akute Ekzemreaktion ausheilt oder chronifiziert, ist nicht bekannt; hier besteht großer Forschungsbedarf.

Sind T-Zellen die Effektorzellen der Ekzemreaktion, indem sie in den Keratinozyten Apoptose induzieren [128,140,143], so könnten Makrophagen, IDEC und Eosinophile Granulozyten zu der Unterhaltung und Chronifizierung der Immunreaktion im Entzündungsgebiet beitragen und darüber hinaus durch die Produktion von IL-12 für die sich ab 96 Stunden nach Provokation ausbildende Dominanz einer Typ 1-Antwort verantwortlich sein.

5.2 Keratinozyten: Immunmodulatoren der Ekzemreaktion

Keratinozyten sind auf empfindliche Weise in die Ekzemreaktion eingebunden. Die Induktion von Apoptose durch T-Zellen mit der konsekutiven Auflösung des Zellverbandes und damit der schützenden Barriere vor Umwelteinflüssen in Kombination mit dem entzündlichen Milieu, das sowohl von infiltrierenden als auch ortsständigen Zellen unterhalten wird, imponiert klinisch als Ekzem-Reaktion.

Keratinozyten fungieren in der Ekzem-Reaktion aber auch als Immun-Modulatoren: sie tragen auf unterschiedliche Reize und Stressoren aus der Umwelt, aber auch bei intrinsischen Prozessen aktiv zu einer Aggravation und Unterhaltung der Entzündungsreaktion bei, indem sie proinflammatorische Substanzen wie IL-1 oder TNF-α, Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, IL-7 und IL-15 und Adhäsionsmoleküle, beispielsweise ICAM-1 und MHC-II, produzieren und exprimieren [21,140,143].
Keratinozyten können die Immunantwort aber auch in eine bestimmte Richtung lenken, denn sie verfügen über ein Arsenal an Chemokinen, mit denen sich bevorzugt Immunzellen eines Typs anlocken lassen und sind imstande, direkt durch polarisierende Zytokine wie den Typ 1-induzierenden IL-12 und IL-18 oder dem Typ 2-begünstigenden IL-10 auf die Immunantwort Einfluss zu nehmen [12,110].
Die Beobachtung, dass aktivierte Keratinozyten Apoptose-induzierende Moleküle wie Fas Ligand, Granzym B [15] und TRAIL [108] exprimieren, lässt Raum für Spekulationen über eine Beteiligung der Keratinozyten an der Limitierung der allergischen Ekzem-Reaktion. Eine mit der T-Zell-Linie „Jurkat“, die den Fas-Rezeptor im Unterschied zu primären T-Zellen konstitutiv exprimiert, durchgeführte Studie gibt erste Hinweise auf eine mögliche Apoptose-Induktion durch Keratinozyten in T-Zellen [8]. Dieses System ist jedoch von der *in vivo*-Situation zu weit entfernt, um verlässliche Aussagen über die allergische Ekzem-Reaktion machen zu können.

Andere Studien weisen die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Apoptose in der Ekzem-Reaktion nach [115,128,129,143]. Die meisten dieser Untersuchungen sind jedoch durch zwei Zugeständnisse an eine einfache Realisierbarkeit weit von der Ekzem-Induktion *in vivo* entfernt: sie wurden erstens nicht im Allergen-spezifischen System angestellt, die T-Zellen oder PBMC wurden also nicht Antigen-spezifisch über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert. Zweitens verwendeten die Untersucher allogene Keratinozyten als Zielzellen.
Um diese Nachteile zu überwinden, wird in anderen Studien die Generierung eines humanen autologen Allergen-spezifischen *in vitro*-Ekzem-Modells beschrieben: hierzu wurden im peripheren Blut zirkulierende Nickel-spezifische T-Zellen isoliert. Durch die Koinkubation mit autologen Keratinozyten wurden unspezifische MHC I-restringierte Reaktionen verhindert, die beobachteten Effekte waren von der spezifischen Allergen-Zugabe abhängig. In diesem System der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel war es erstmals möglich, die Beteiligung verschiedener

Subtypen von T-Zellen an der allergischen Ekzem-Reaktion sowie mögliche Mechanismen der Keratinozyten-Schädigung zu untersuchen [24,26,49,122,140]. Eine solche Untersuchung setzt die Individual-spezifische Bindung der α3-Domäne des MHC-I an den Korezeptor CD8 bzw. der β2-Domäne des MHC-II an den Korezeptor CD4 voraus, die nur im autologen Modell erfolgen kann [1].
So konnte nachgewiesen werden, dass CD8+ T-Zell-Klone ruhende Keratinozyten in Apoptose bringen, während CD4+ T-Zell-Klone dazu erst in der Lage waren, nachdem die Keratinozyten mit INF-γ vorbehandelt worden waren, also auch MHC-II exprimierten [140]. Durch Antikörper gegen MHC-I konnte in einem anderen Ansatz die Apoptose-Induktion der T-Zellen in ruhenden, nicht aber in IFN-γ vorbehandelten Keratinozyten, blockiert werden [128].

Die vorliegende Arbeit untersucht die immunmodulatorische Aktivität von Keratinozyten in der Ekzemreaktion in einem solchen realitätsnahen *in vitro*-Ekzem-Modell der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel. Um dieses Modell zu etablieren, mussten zunächst Allergen-spezifische Klone generiert und umfangreich charakterisiert werden.
In einem zweiten Schritt wurden diese T-Zell-Klone in Anwesenheit von APC mit primären, autologen Keratinozyten koinkubiert und damit die Effektorphase der Ekzemreaktion vereinfacht *in vitro* nachgestellt.
Diese Koinkubationen wurden zunächst morphologisch beurteilt, wobei die Interaktionen von T-Zellen und Keratinozyten mit den im immunhistochemischen Teil der Arbeit gewonnenen morphologischen Erkenntnissen verglichen wurden.
Schließlich wurde der Einfluss von Keratinozyten auf T-Zell-Klone beurteilt, wobei die Parameter Proliferation und Zytokinproduktion als Endpunkt ausgewählt wurden.

5.2.1 Etablierung des autologen, Allergen-spezifischen Ekzem-Modells

Es existieren viele Subgruppen von T-Zellen, die unterschiedliche immunologische Aufgaben, so Modulation, eigentlichen Effekt wie Apoptose-Induktion und schließlich Limitierung wahrnehmen; eine genaue Charakterisierung der generierten T-Zell-Klone war deshalb für die Interpretation der Interaktionen mit Keratinozyten von

großer Bedeutung. Neben der Unterscheidung CD4+ und CD8+ T-Zellen spielte dabei als Kriterium der Differenzierung vor allem das Zytokinprofil eine Rolle.

Vier von insgesamt 24 Nickel-spezifischen T-Zell-Klonen wurden im Durchflußzytometer als CD8+ Zellen charakterisiert, was einem Anteil von 16,7% entspricht; die 20 verbleibenden Klone gehörten dem CD4+ Subtyp an.
Dieses quantitative Übergewicht von CD4+ Klonen spiegelt sich bereits in dem Proliferationsverhalten der T-Zell-Linien wieder, aus denen die Klone isoliert wurden: die Antigen-spezifische Proliferation war bei den für CD4 positiv-selektionierten Linien beider untersuchter Patienten im Mittel über achtmal höher, wenn dem Ansatz Nickel zugegeben wurde. Bei den CD8+ T-Zell-Linien lag der Proliferationsindex im Mittel nur bei 2,5.
Daraus lässt sich schließen, dass im peripheren Blut deutlich mehr CD4+ als CD8+ Nickel-spezifische T-Zellen zirkulieren, was zu der Beobachtung passt, dass CD8+ T-Zell-Klone hauptsächlich Effektorfunktion haben, während den CD4+ T-Zellen sowohl Helfer- und Effektor-, als auch Limiterungsaufgaben zukommen [24,47].
Die beobachtete Ratio aus CD8+ zu CD4+ Klonen stimmte in etwa mit in der Literatur beschriebenen Verteilungen für Nickel- (21% CD8+ Klone), [152] und Hausstaub-spezifische Klone (27% CD8+ Klone im peripheren Blut, 15% in der Haut), [253] überein.

Innerhalb der Subtypen von T-Zellen gab es Klone mit unterschiedlich starken Proliferationsantworten auf Nickel, die von einer ungefähren Verdoppelung der Zellteilungen bis zu einer Erhöhung um den Faktor 35 reichten; teilte man die Klone nach der Intensität ihrer Reaktion auf Nickel in Gruppen ein, so zeigte sich das Bild einer Gauß´schen Normalverteilung.
In der Literatur ist eine Subgruppe Nickel-spezifischer Klone beschrieben, die ohne die Antigen-Präsentation durch APC auf ihr spezifisches Allergen hin proliferieren können [99]. Diese Allergen-Präsentation ist MHC-II-restriktiv, unabhängig vom Aktivierungs-Zustand des Klons und setzt kein Cross-linking voraus. Das Hapten wird durch diese T-Zellen also vermutlich auto- oder parakrin über den T-Zell-Rezeptor präsentiert; der genaue Mechanismus ist jedoch unklar.
Andere Nickel-spezifische Klone sind zu dieser APC-unabhängigen Proliferation nicht in der Lage, sie sind auf eine professionelle Antigen-Präsentation angewiesen.

Auch in der vorliegenden Arbeit fielen beide Typen von T-Zell-Klonen auf, wobei die Frequenz der nicht auf APC angewiesenen Klone mit 70% doppelt so hoch war wie in der erwähnten Untersuchung.

Die Analyse der Zytokinprofile der T-Zell-Klone zeigte deutliche Unterschiede unter den Klonen. Dabei war ein klares Überwiegen von Th0- (40%) und Th1- (45%) Klonen feststellbar, reine Th2-Klone konnten nicht isoliert werden; dies lag teilweise am System der Zytokinbestimmung, die in der Regel 48 Stunden nach Restimulierung eines Klons mit dem Maximal-Stimulus PHA und teilungsunfähigen, aber zunächst noch vitalen PBMC durchgeführt wurde. Die relative Verteilung der Zytokine ließ jedoch drei CD4+ Klone erkennen, die hohe Mengen an IL-4 produzierten und deshalb als Th2-Klone eingeordnet wurden (15%).
Auch bei den vier CD8+ Klonen dominierten der Tc0- (50%) und der Tc1- (50%) Zell-Typ. Tc2 Klone wurden nicht beobachtet.
Bezüglich der APC-Abhängigkeit wurde beschrieben, dass meist Th1-Klone APC-unabhängig seien [99]. Dieser Trend konnte bei niedriger Fallzahl in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Verteilung der Subtypen von T-Zellen folgt somit der Hypothese eines T-Helfer 1/ IFN-γ-vermittelten Immunprofils der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel.
In der Literatur wurden ähnliche Relationen von T-Zell-Subpopulationen auch bei anderen allergischen Erkrankungen wie dem atopischen Ekzem beobachtet: so wurde hier ein Überwiegen von Hausstaub-spezifischen Typ 0- und Typ 1-T-Zellen im peripheren Blut beschrieben, die Frequenz von Th2-Klonen, die ausschließlich IL-4 produzierten, betrug in dieser Untersuchung 8%, T-Zell-Klone mit hoher IL-4-Expression wurden als Th2-Klone klassifiziert und machten vier von 20 (20%) Klonen aus [153].
Selbst bei der eher Th2-vermittelten allergischen Rhinitis auf Gräserpollen wird eine Verteilung von 47% (18/38) Gräserpollen-spezifischen Th0-, 32% (12/38) Th1- und 21% (8/38) Th2- Zellen im peripheren Blut von sensibilisierten Individuen beschrieben [157].

5.2.2 Morphologie der Zell-Zell-Interaktionen

Viele der proinflammatorischen und zytotoxischen Mechanismen von T-Zellen sind Zell-Kontakt-abhängig. Im ersten Teil der Arbeit wurde histologisch und immunhistochemisch eine morphologische Interaktion von Keratinozyten und T-Zellen, besonders in Gebieten starker Hautschädigung, in Biopsien von iatrogen induzierten akuten Ekzem-Läsionen beobachtet und dargestellt.
Um beurteilen zu können, ob die Vorraussetzung für die gegenseitigen Zellkontakt-abhängigen Effekte beider Zelltypen auch im Allergen-spezifischen *in vitro*-System gegeben sind, wurden die Koinkubationen sowohl Licht- als auch Elektronen-mikroskopisch charakterisiert.

In allen Kokultur-Ansätzen, bei denen die Bedingungen für eine Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von Nickel – und bei APC-abhängigen Klonen zusätzlich von APC – gegeben waren, konnten im Lichtmikroskop Gruppierungen von T-Zellen, die morphologische Zeichen von Aktivierung aufwiesen, mit Keratinozyten beobachtet werden, wobei die T-Zellen in direktem Kontakt zu den Keratinozyten standen. Dagegen fehlte diese räumliche Interaktion, wenn die Klone ihr spezifisches Allergen nicht erkannten.

Eine solche Allergen-abhängige Interaktion konnte auch Raster-Elektronen-mikroskopisch dargestellt werden, indem in Suspension befindliche Keratinozyten mit T-Zell-Klonen koinkubiert wurden; nach 24 Stunden konnten in den Ansätzen ohne Nickel vitale, adhärente Keratinozyten beobachtet werden, während die in Suspension gebliebenen T-Zellen durch die methodische Aufbereitung, die mit einigen Wasch-Schritten verbunden ist, verloren gegangen waren.
Hatten die T-Zellen dagegen das spezifische Allergen erkannt, gingen sie mit den Keratinozyten so stabile Verbindungen ein, dass sie trotz der Wasch-Schritte im Vorfeld der Aufnahme darstellbar waren: die adhärenten Keratinozyten waren von T-Zellen gesäumt und kugelten sich – evtl. als morphologisches Zeichen von Zell-Stress – ab.

Zusammenfassend konnten *in vitro* morphologisch enge Allergen-abhängige Interaktionen zwischen T-Zellen und Keratinozyten beobachtet werden, die die

Voraussetzung für eine Vielzahl von in der Literatur beschriebenen gegenseitigen Effekten in der allergischen Ekzemreaktion sind. Diese engen Interaktionen sind ein guter Hinweis darauf, dass das etablierte Ekzem-Modell der *in vivo*-Situation einer akuten Ekzemreaktion nahe kommt.

5.2.3 Beeinflussung der Proliferation von T-Zellen durch Keratinozyten

Nickel-spezifische T-Zell-Klone reagierten auf die Präsentation ihres spezifischen Allergens mit Proliferation. Der Unterschied der Synthese-Rate von DNA in der G0-Phase der Mitose, der mit der Teilungsaktivität korreliert, zwischen unstimulierten Kontroll-Ansätzen und Nickel-Stimulation, wurde durch die Bildung eines Quotienten, den Proliferationsindex (PI), charakterisiert.
Um die Veränderung der Allergen-spezifischen Proliferation der Klone in Anwesenheit von Keratinozyten beschreiben zu können, wurde der Index p aus den PI von Ansätzen mit/ohne Keratinozyten errechnet.

Dieser Index p ergab einen bei allen elf in Koinkubations-Experimenten eingesetzten Klonen reproduzierbaren Wert; bei zwei Drittel der Klone lag dieser Wert unter eins, die Allergen-spezifische Proliferation dieser Klone wurde durch Keratinozyten also gehemmt; in einem Drittel der Fälle nahm der Index p einen Wert größer eins an, diese Klone wurden also durch Keratinozyten in ihrer Proliferation auf das spezifische Allergen Nickel hin noch weiter induziert. Bei einem selbstständigen, also für eine Proliferation nicht auf APC angewiesenen Klon ergab sich ein uneinheitliches Bild: er wurde abhängig von der Zugabe von APC, ebenfalls reproduzierbar, unterschiedlich beeinflusst.

Ein eindeutiges Stigma, das erklären könnte, warum einige Klone inhibiert und andere induziert wurden, konnte nicht ausgemacht werden; weder hinsichtlich des Zytokinprofils, noch der Intensität der Proliferation auf Nickel, der CD4+ oder CD8+ Subgruppe oder der Fähigkeit, sich das Nickel selbst zu präsentieren, waren die Gruppen homogen.

Die beobachteten Effekte von Keratinozyten auf T-Zell-Klone waren dabei unabhängig von einer 24stündigen Vorstimulation mit IFN-γ, das die Expression einer Reihe von proinflammatorischen und für Zell-Zell-Kontakte sowie für die Antigen-Erkennung wichtigen Molekülen wie MHC-II [154] induziert. Die Bedeutung einer solchen Vorstimulation könnte durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ durch die T-Zell-Klone, die im Zytokinprofil nachgewiesen wurde, während der 48 bis 72stündigen Koinkubation nivelliert worden sein.
Drei von vier getesteten Klonen zeigten bei Koinkubation mit heterologen Keratinozyten eine verglichen mit autologen Keratinozyten identische Reaktion; der Klon SH4.3.16 ließ sich unabhängig von einer Vorstimulation mit IFN-γ nur durch autologe Keratinozyten hemmen. Dies lässt auf MHC-restriktive Mechanismen schließen.
Insgesamt scheinen heterogene Mechanismen im Einfluss auf die T-Zellen wahrscheinlich, wobei sowohl MHC-restringierte als auch -unabhängige Wege zu existieren scheinen.

Auch eine von fünf auf elf Tage verlängerte Kulturzeit der Keratinozyten veränderte den Einfluss auf die T-Zell-Proliferation nicht. Der Grad der Konfluenz in den Zellkultur-Flaschen, der ein wichtiger Parameter der Differenzierung der Keratinozyten darstellt, variierte dabei infolge der geringeren Ausgangszahl bei elf Tage in Kultur gehaltenen Zellen kaum.

Die Inhibierung der de novo-Proteinsynthese durch Blockierung des Golgi-Apparates mittels Brefeldin A in Keratinozyten zeigte eine von Klon zu Klon unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmung des Effekts, die jedoch insgesamt eher schwach war. So scheint der beobachtete Effekt teilweise und in von T-Zell-Klon zu T-Zell-Klon unterschiedlich starkem Ausmaß von Proteinen, die während der Koinkubation neu gebildet werden, vor allem aber von in Keratinozyten präformierten modulatorisch wirksamen Molekülen getragen zu sein (vgl. 5.2.5).

5.2.4 Modulation des Zytokinprofils

Die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen durch T-Zell-Klone veränderte sich wie das Proliferationsverhalten auf eine Kokultur mit Keratinozyten hin für jeden Klon reproduzierbar. Die Veränderung des Zytokin-Profils war dabei unabhängig von der Veränderung der Proliferation.

Die Produktion des Th2-Zytokins IL-4 war bei allen untersuchten Klonen durch Keratinozyten signifikant inhibiert. Eine Ausnahme bildete nur der Th2-Klon SH4.3.16, bei dem die Ausschüttung von IL-4 praktisch unverändert war.
Keratinozyten scheinen somit das Zytokinprofil eines T-Zell-Klons in Typ 1-Richtung zu modulieren. Diese Beobachtung passt zu dem Ergebnis des bipolaren Zytokinprofils der Immunreaktion auf nativen Pollen. Wandern bei dieser Reaktion aufgrund des lokalen Milieus und der Sofortreaktion auf Pollen-Bestandteile in der Frühphase hauptsächlich Th2-Zellen ein, so überwiegen in der Spätphase der Reaktion Th1-Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen die Spekulation zu, dass Keratinozyten an der beschriebenen Modulation der T-zellulären Immunantwort beteiligt sind (vgl. 5.1.6).

Die Menge an in Anwesenheit von Keratinozyten gebildetem IL-10 fiel bei der überwiegenden Mehrheit der Klone um über 90% ab. IL-10 kommt in dieser Reaktion in dreifacher Hinsicht Bedeutung zu:
Es ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das eine Th2-Antwort begünstigt [33,88]. Die Inhibierung dieses Zytokins durch Keratinozyten könnte also ein weiterer Beleg der aktiven Lenkung der Immunantwort durch Keratinozyten sein, die im Falle der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel in Richtung des Typ 1-Armes der T-Zell-Antwort geht.
IL-10 ist daneben immunsuppressiv wirksam; so wurde gezeigt, dass IL-10 sowohl direkt die Proliferation von T-Zellen [131] als auch deren Produktion proinflammatorischer Zytokine [38] inhibieren kann. Durch Wegfall dieser suppressorischen Mechanismen sind Keratinozyten also in der Lage, den inflammatorischen Prozess während der Effektor-Phase der Ekzem-Reaktion, und damit praktisch eine verschärfte Sicherheits-Stufe des Immunsystems mit vermehrter

Allergen-Präsentation und intensivierter Zirkulation von Immunzellen, zu prolongieren.
In einer bereits erwähnten Studie wird eine Apoptose-Induktion von Keratinozyten in der T-Zell-Linie „Jurkat“ belegt [8]. In dieser Studie konnte diese Induktion durch IL-10 aufgehoben werden. Die Keratinozyten scheinen also die Gegenmaßnahmen von T-Zellen durch Inhibierung derer IL-10-Ausschüttung zu unterdrücken. Durch den Wegfall des immunsuppressiven systemischen Effekts von IL-10 scheinen Keratinozyten gleichzeitig eine erhöhte Warnstufe des Immunsystems aufrechtzuerhalten und zu einer möglichen Chronifizierung der Ekzemreaktion beizutragen.

Das proinflammatorische Th1-Zytokin IFN-γ dagegen wurde heterogen beeinflusst; alle durch Keratinozyten in ihrer Proliferation induzierten T-Zell-Klone schütteten höhere Mengen des Zytokins aus, während der Gehalt im Überstand gehemmter Klone in Kokultur überwiegend erniedrigt, teilweise aber auch unverändert oder erhöht war.
Daraus lässt sich schließen, dass der Regulation der IFN-γ-Produktion von T-Zellen unterschiedliche gegensätzliche Einfluss-Faktoren auf Keratinozyten-Seite zugrunde liegen; während die von Keratinozyten exprimierten proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α wie auch die Typ 1-induzierenden Zytokine IL-7 und IL-15 die Produktion stimulieren, scheinen andere Faktoren in den insgesamt gehemmten Klonen eine Inhibierung des Zytokins auszulösen.

5.2.5 Hypothese: Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen von Keratinozyten und T-Zellen in der Ekzem-Reaktion

Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte von Keratinozyten auf die Proliferation und Aktivierung Allergen-spezifischer T-Zell-Klone lassen unter Einbeziehung von in der Literatur vorbekannten Ergebnissen folgende Hypothese der Keratinozyten-T-Zell-Interaktionen im allergischen Ekzem zu (vgl. Abb.5.2-1):

Gegenseitige Aktivierungskaskade

Auf die Haut auftreffende Allergene werden durch Populationen dendritischer Zellen und Zellen des innaten Immunsystems über MHC-Moleküle (hauptsächlich MHC-I) aufgenommen und präsentiert. Es kommt zu einer Aktivierung des Immunsystems und damit zu einem lokalen entzündlichen Milieu, in dem sowohl Allergen-spezifische T-Zellen als auch Keratinozyten aktiviert werden.

Beide Zelltypen reagieren mit einem umfangreichen Expressionsprogramm proinflammatorischer Moleküle, die sich einer Spirale gleich gegenseitig verstärken und in einer starken gegenseitigen Aktivierung resultieren: während das in T-Zellen gebildete IFN-γ in Keratinozyten die Bildung und Ausschüttung von Adhäsionsfaktoren wie ICAM-1 und MHC-II, Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und von Defensinen und Chemokinen auslöst [21,140,143], bewirken umgekehrt die in Keratinozyten gebildeten Faktoren IL-1β, TNF-α, IL-12 und IL-18 [57,73,78,95,97,98,159] eine Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen sowie eine Immunmodulation in Richtung Typ 1-T-Zellen.

Ein starker Mechanismus der aufgeführten gegenseitigen Aktivierungskaskade scheint dabei die Inhibierung von T-Zell-IL-10 durch Keratinozyten zu sein, das sowohl die Expression proinflammatorischer Moleküle als auch direkt die T-Zell-Proliferation unterdrücken kann [38,131].

Gleichzeitig bieten Keratinozyten den T-Zellen einen Wachstumsstimulus und Protektion vor Apoptose durch die T-Zell-trophischen Zytokine IL-7 und IL-15 dar [58,61]. Für IL-7 konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, an deren Rezeptor IL-7 gebunden hatte, weniger anfällig für Apoptose-Induktion etwa durch Fas-Moleküle waren [68]; zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine Studie über IL-15 [86].

Effektorfunktionen der T-Zellen

Dem Arsenal sich gegenseitig beeinflussender proinflammatorischer löslicher Botenstoffe folgen nun durch direkten Zell-Kontakt ausgelöste Effekte. Der Zell-Kontakt kommt durch das Zusammenspiel aus der Expression der oben beschriebenen Chemokine und Adhäsionsfaktoren zustande. Neben der spezifischen MHC-II/T-Zell-Rezeptor-Bindung scheint dabei vor allem ein kostimulatorisches Signal über die Interaktion zwischen dem in der Aktivierungskaskade induzierten ICAM-1 auf Keratinozyten-Seite und dem LFA-1 der T-Zellen eine Rolle zu spielen [100].

Die T-Zellen töten ihre Zielzellen, die Keratinozyten, durch Ausschüttung von Granzym B und Perforin [15] sowie durch Interaktionen von Todesrezeptoren wie Fas Ligand und dem Fas Rezeptor auf Keratinozyten [24,51,140,143]. Dies stellt einen Mechanismus der Ekzementstehung dar. Die Mechanismen, die zum Hauptcharakteristikum – der Spongiose – führen, sind weniger verstanden. Einzelberichte stellen einen direkten Effekt der T-Zellen auf Keratinozyten-Keratinozyten-Kontakt-Moleküle wie Cadherine, dar [144].

Immunmodulation durch Keratinozyten

Keratinozyten können die Immunreaktion modulieren, indem sie T-Zellen entweder weiter induzieren und stimulieren (vgl. Abb. 5.2-1; 4A) oder umgekehrt inhibieren (vgl. Abb. 5.2-1; 4B).

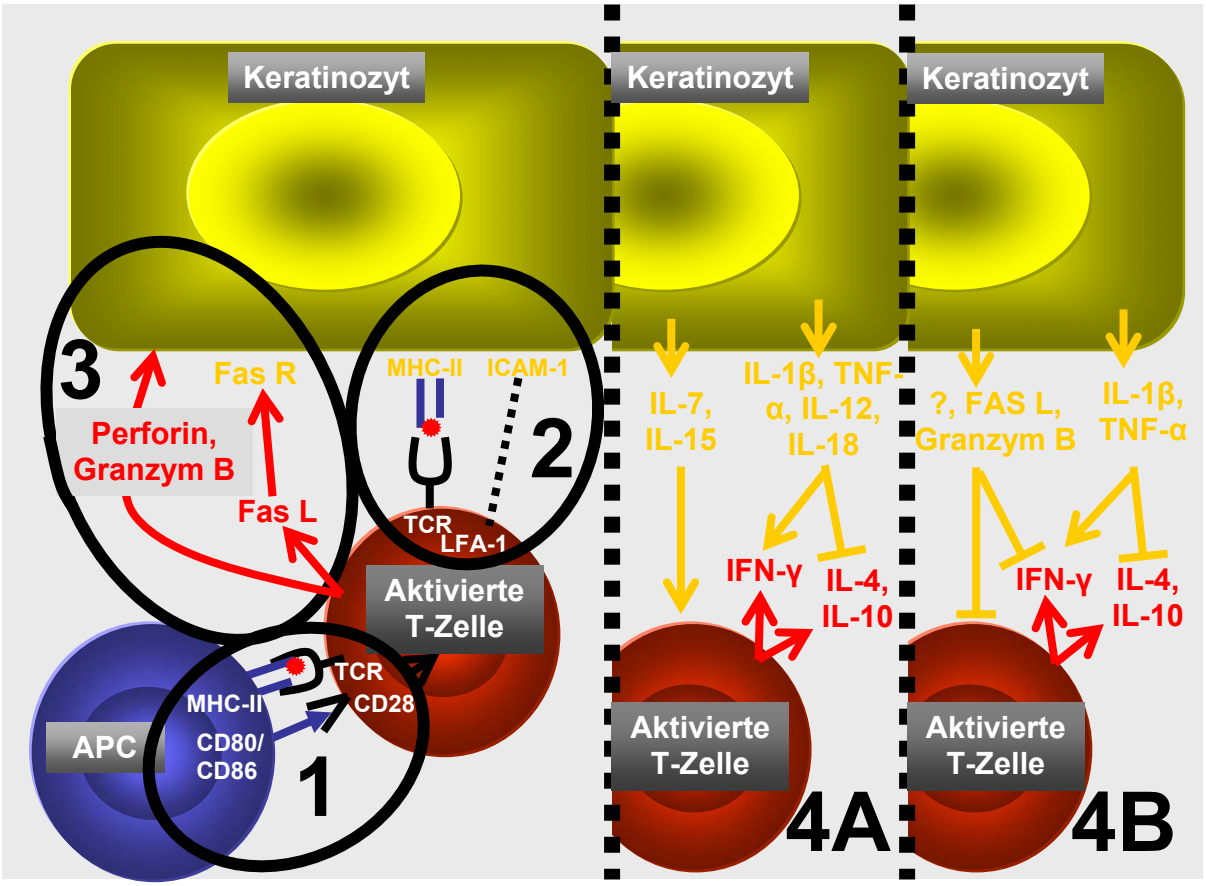


Abb. 5.2-1a. Zell-Zell-Interaktionen von Keratinozyten und Allergen-spezifischen T-Zellen in der Effektorphase der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel. In einem ersten Schritt werden die T-Zellen durch professionelle APC aktiviert (1), es folgt die Allergen-spezifische Adhäsion an Keratinozyten (2), schließlich lösen die T-Zellen in den Keratinozyten Apoptose aus (3). Die Keratinozyten reagieren mit der Ausschüttung von Zytokinen, die die T-Zellen entweder weiter aktivieren (4A) oder hemmen (4B), wobei die Zytokinproduktion der T-Zellen unabhängig von der Aktivierung reguliert wird.

In welche der genannten Richtungen eine T-Zelle beeinflusst wird, hängt davon ab, wie sie auf die unterschiedlichen dargebotenen Stimuli reagiert.
So scheint die Induktion der T-Zellen ein Prozess zu sein, der vor allem durch die proinflammatorischen und T-Zell-trophischen Zytokine vermittelt sein dürfte.
Die Hemmung von Aktivierung und Proliferation der T-Zellen könnte beispielsweise durch eine Anergie-Induktion durch eine Präsentation von Nickel über MHC-II in Abwesenheit eines kostimulatorischen Moleküls erfolgen [11,45].
Sie könnte aber auch auf den auf Keratinozyten nachgewiesenen Apoptose-induzierenden Molekülen Granzym B und Fas Ligand beruhen, die auf suszeptible T-Zellen wirken könnten. Fas wird als Immun-Homeostase-Molekül beschrieben, das autoreaktive Lymphozyten in Apoptose bringen kann [16,123]. Der heterogene Einfluss auf die Produktion von IFN-γ in gehemmten Klonen lässt sich dabei aus der Ambivalenz der beschriebenen hemmenden Faktoren und der stimulierenden Zytokine erklären.
Ob eine T-Zelle sensitiver auf die aktivierenden oder auf die inhibierenden Stimuli reagiert, wird durch ihr Rezeptorpotential bestimmt. Die Expression einiger Rezeptoren wie dem für IL-7 (CD127), [61], dem IL-15Rα [58], dem LFA-1, das T-Zellen für kostimulatorische Signale sensibilisiert [100] oder dem IL-1R1 und 2, die T-Zellen empfindlicher für proinflammatorische Stimuli machen [132], bedeutet für die T-Zelle eine verstärkte Aktivierung und Induktion. Auch der IL-18Rα, der besonders von T-Gedächtniszellen exprimiert wird [35], könnte in die beschriebene Aktivitätskaskade eingebunden sein [107]; eine Blockierung von IL-18Rα konnte im Mausmodell sogar die klinische Ausbildung einer allergischen Kontaktdermatitis verhindern [17].
Dagegen steht die Expression inhibierender oder Apoptose-auslösender Rezeptoren wie dem FasR [8] oder dem IL-10R1 [38,131]. Diese Rezeptoren terminieren die Aktivierung von T-Zellen.
Bei anderen Rezeptoren scheint allein die Homeostase gegensätzlich wirkender Liganden entscheidend für ihre Wirkung auf die T-Zelle zu sein, so für den gemeinsamen Rezeptor für IL-7, IL-15 und IL-2, dem IL-2Rγ, der eine wichtige Rolle bei der Aktivierung, aber auch beim „activation induced cell death“ zu spielen scheint [87]. Für TNF-α scheint es auf T-Zellen umgekehrt zwei Rezeptoren zu geben, die gegensätzlich wirken: der TNFR1 unterbricht demnach das intrazelluläre Kalzium-Signal und wirkt so inhibierend auf die Zelle [28], während beispielsweise der

TNFRp75, der besonders in der rheumatoiden Arthritis exprimiert wird, die Zelle aktiviert [7].

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Interaktionen von Keratinozyten und T-Zellen in der allergischen Ekzemreaktion. Ein auf klinischer und immunologischer Basis durchgeführter Vergleich der Atopie Patch Test-Reaktion auf Pollen mit dem Nickel-Epikutantest erbrachte bei einigen Unterschieden eine grundsätzlich vergleichbare Immunreaktion, die mit einem massiven Influx von T-Zellen in Dermis und Epidermis einherging. Mittels eines autologen und spezifischen *in vitro* Ekzem-Modells konnte eine über die Effektorfunktionen der T-Zellen hinausgehende Bedeutung dieser morphologischen Interaktion enthüllt werden: Keratinozyten modulieren die durch T-Zellen vermittelte Immunantwort und greifen somit aktiv in den Prozess der allergischen Ekzemreaktion in der Haut ein.

Um die immunologischen Vorgänge von zwei häufigen allergischen Ekzemreaktionen – dem atopischen Ekzem und der allergischen Kontaktdermatitis – *in vivo* charakterisieren zu können, wurden durch Patch Test-Verfahren (APT bei Patienten mit AE, Epikutantest bei Nickel-Allergikern) in sensibilisierten Individuen akute Ekzeme induziert. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Allergen-Provokation biopsiert und histologisch sowie immunhistochemisch analysiert.
Histologisch zeigte sich in Biopsien aus den klinisch identischen akuten Ekzemen beider Patientengruppen neben ausgeprägten Zeichen von Zellschaden eine massive Infiltration mononukleärer Zellen in Dermis und Epidermis, die immunhistochemisch als teilweise aktivierte, zumeist CD4+ T-Gedächtniszellen imponierten.
Die Immunreaktion auf Pollen unterschied sich in vier Punkten von der Kontaktdermatitis auf Nickel:

A Sowohl klinisch als auch histologisch folgte sie einer beschleunigten Kinetik. Im APT lag der Höhepunkt der Reaktion bei 48 bis 72 Stunden, im NPT bei 72 bis 96 Stunden nach Allergenprovokation.

B Ihr Zytokinprofil nahm einen biphasischen Verlauf: von Th2-dominiert in der Frühphase zu Th1-dominiert in der Spätphase der Immunantwort. Die Nickelreaktion war klar Th1-dominiert.

C Marker für Antigen-präsentierende Zellen wie CD1a+ waren stärker exprimiert.

D Sie war begleitet von einer Crescendo-Decrescendo-Reaktion von IgE mit Höhepunkt nach 24 Stunden. IgE war in NPT-Biopsien nicht nachweisbar.

Im Ergebnis zeigte sich eine grundsätzliche Vergleichbarkeit zwischen dem Pollen-induzierten Ekzem und der Kontaktdermatitis auf Nickel. Die Beschaffenheit des Pollen (-Allergens) und die Beteiligung von spezifischem IgE bei Patienten mit AE scheinen die Immunantwort in ihrer Frühphase hinsichtlich Kinetik, Antigenpräsentation und Zytokinprofil infiltrierender T-Zellen zu modulieren, während im weiteren Verlauf der Reaktionen klinisch, histologisch und immunhistochemisch identische Vorgänge der Ekzem-Induktion eine Rolle zu spielen scheinen.

Diese Vorgänge basieren immunologisch unter anderem auf den Interaktionen zwischen Keratinozyten und T-Zellen. Um sie *in vitro* studieren zu können, wurde ein spezifisches autologes Ekzem-Modell der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel etabliert. Von Nickel-Allergikern wurden primäre Keratinozyten gewonnen, aus deren peripherem Blut Nickel-spezifische T-Zellen isoliert und zu T-Zell-Klonen expandiert. Die Klone entsprachen hinsichtlich ihrer Subpopulationen (CD4/CD8, Th0/Th1/Th2) in Frequenz und Verteilung den in der Literatur angegebenen Dimensionen, so dass von einem realitätsnahen Gesamtbild ausgegangen werden kann.

Aus Kokulturen von T-Zellen, Keratinozyten und autologen APC ergaben sich folgende Ergebnisse:

A Morphologisch ergaben sich Licht- und Elektronen-mikroskopisch Allergen-abhängig enge räumliche Interaktionen zwischen aktivierten T-Zellen und Keratinozyten, die Anzeichen von Zell-Stress zeigten.

B Keratinozyten modulierten die Proliferation von T-Zellen reproduzierbar, meist im Sinne einer Inhibierung, selten im Sinne einer Induktion.

C Unabhängig von ihrem Effekt auf die Proliferation modulierten Keratinozyten auch die Zytokin-Produktion der T-Zellen. INF-γ wurde uneinheitlich reguliert, IL-4 und IL-10 inhibiert.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung der Interaktionen von Keratinozyten und T-Zellen in der Effektorphase der allergischen Ekzemreaktion. Das Ergebnis dieser Arbeit – Keratinozyten modulieren reproduzierbar die Allergen-spezifische Reaktion von T-Zellen – könnte in der Zukunft zu neuen Therapie-Ansätzen von ekzematösen Hauterkrankungen führen.

IV Literaturverzeichnis

1. Abbas AK, Lichtman AH. Antigen capture and presentation to lymphocytes; cell-mediated immune responses. In: Abbas AK, Lichtman AH (Hrsg.). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. WB: Saunders Company, USA, 2001, 1.Auflage
2. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson MG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive T cells. Nat Immunol. 2002; 3: 549-557
3. Agea E, Russano A, Bistoni O, Mannucci R, Nicoletti I, Corazzi L, Postle AD, De Libero G, Porcelli SA, Spinozzi F. Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. J Exp Med. 2005; 202: 295-308.
4. Ai MD, Li LL, Zhao XR, Wu Y, Gong JP, CAO Y. Regulation of survivin and CDK4 by Ebstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. Cell Res. 2005; 15: 777-84
5. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Crameri R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. J Exp Med 2004; 199: 1567-75
6. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, Cavani A, Federici M, De Pita O, Puddu P, Girolomoni G. IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines. J Immunol. 2000; 165: 1395-402
7. Alsalameh S, Winter K, Al-Ward R, Wendler J, Kalden JR, Kinne RW. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. Scand J Immunol. 1999; 49: 278-85
8. Arnold R, Seifert M, Asadullah K, Volk HD. Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas Ligand interaction: modulation by cytokines. J Immunol. 1999; 162: 7140-7147
9. Arruda LK, Sole D, Baena-Cagnani CE, Naspitz CK. Risk factors for asthma and atopy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005; 5: 153-159

10. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med. 2002; 347: 911-20
11. Bal V, MC Indoe A, Denton G, Hudson D, Lombardi G, Lamb J, Lechler R. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. Eur J Immunol. 1990; 20:1893
12. Banerjee G, Damodaran A, Devi N, Dharmalingam K, Raman G. Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. Scand J Immunol. 2004; 59: 385-94
13. Bangert C, Friedl J, Stary G, Stingl G, Kopp T. Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? J Invest Dermatol. 2003; 121: 1409-9
14. Basile JR, Zacny V, Münger K. The cytokines Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) and TNF-related apoptosis inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. J Biol Chem. 2001; 276: 22522-6
15. Berthou C, Michel L, Soulié A, Jean-Louis F, Flageul B, Dubertret L, Sigaux F, Zhang Y, Sasportes M. Acquisition of granzyme B and Fas Ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. J Immunol. 1997; 159: 5293-5300
16. Bettinardi A, Brugnani D, Quiras-Roldan E, Malagoli A, La Grutta S, Correra A, Notarangelo LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative sindrome: a molecular and immunological analysis. Blood. 1997; 89: 902-909
17. Bofill M, Almirall E, McQuaid A, Pena R, Ruiz-Hernandez R, Naranjo M, Ruiz L, Clotet B, Borras FE. Differential expression of the cytokine receptors for human interleukin (IL)-12 and IL-18 on lymphocytes of both CD45RA and CD45RO phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood. Clin Exp Immunol. 2004; 138: 460-5
18. Braback L, Hjern A, Rasmussen F. Trends in asthma, allergic rhinitis and eczema among swedish conscripts from farming and non-farming enviroments. A nationwide study over three decades. Clin Exp Allergy. 2004; 34: 38-43

19. Breit S, Steinhoff M, Blaser K, Heusser CH, Sebald W, Levine AD, Rocken M. A strict requirement of interleukin-4 for interleukin-4 induction in antigen-stimulated human memory T cells. Eur J Immunol. 1996; 26: 1860-1865
20. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interpheron alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. J Exp Med. 1993; 178: 1655-1663
21. Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. Exp Hematol. 1996; 24: 352-9
22. Bukantz SC. Clemens von Pirquet and the concept of allergie. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109: 724-6
23. Cataisson C, Joseloff E, Murillas R, Wang A, Atwell C, Torgerson S, Gerdes M, Subleski J, Gao JL, Murphy PM, Wiltrout RH, Vinson C, Yuspa SH. Activation of cutaneous protein kinase C alpha induces keratinocyte apoptosis and intraepidermal inflammation by independent signaling pathways. J Immunol. 2003; 171: 2703-13
24. Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, Pirrotta L, Puddu P, Girolomoni G. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and non-allergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8+ and regulatory CD4+ T cells. J Invest Dermatol. 1998; 111:621-8
25. Cavani A, Nassori F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pita O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals, J Immunol. 2003; 171: 5760-8
26. Cavani A, Nassori F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. J Invest Dermatol. 2000; 114: 295
27. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. Nature Immunol. 2000; 1: 305-310
28. Church LD, Hessler G, Goodall JE, Rider DA, Workman CJ, Vignali DA, Bacon PA, Gulbins E, Young SP. TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca2+ influx. J Leukoc Biol. 2005; 78: 266-78

29. Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. J Immunol. 1923: 163-182
30. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol. 2004; 5: 1219-26
31. Coombs RRA, Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. In: “Clinical aspects of immunology”, Gell PGH, Coombs RRA (Eds.), Davis, Philadelphia, 1963, 317
32. Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. Cell Immunol. 1989; 118: 108-25
33. D´Andrea A, Aste AM, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med. 1993; 178:1041-48
34. D´Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. J Exp Med. 2000; 191: 1661-1674
35. Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta production induced by direct contact with T lymphocytes: implications in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2004; 50: 432-43
36. Darsow U, Lubbe J, Taieb A, Seidenari S, Wollenberg A, Calza AM, Giusti F, Ring J; European Task Force on Atopic Dermatitis. Position paper on dignosis and treatment of atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2005; 19: 286-95
37. Darsow U, Ring J. Airborne and dietary allergens in atopic eczema: a comprehensive review of diagnostic tests. Clin Exp Dermatol. 2000; 25: 544-7
38. de Waal Malefyt R et al. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. J Immunol. 1993; 150: 4754-65
39. Delescluse J, Dinet Y. Nickel allergy in Europe: the new European legislation. Dermatology. 1994; 189: 56-7
40. Diepgen TL, Coenraads PJ. The epidemiology of occupational contact dermatitis. Int Arch Occup Environ Health. 1999; 72:496

41. Dudda JC, Simon JC, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell traficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. J Immunol. 2004; 172: 857-63
42. Enk AH, Katz SI. Early events in the induction phase of contact sensitivity. J Invest Dermatol. 1992; 99: 39S-41S
43. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development. Roles of instruction, selection, and transcription. J Clin Invest. 2002; 109: 431-435
44. Fehérvari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. J Clin Invest. 2004; 114: 1209-1217
45. Gaspari AA, Jenkins MK, Katz SI. Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. J Immunol. 1988; 141: 2216
46. Gause WC, Halvorsen MJ, Lu P, Greenwald R, Linsley P, Urban JF, Finkelman FD. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. Immunol Today. 1997; 18: 115-120
47. Girolomoni G, Gisondi P, Ottaviani C, Cavani A. Immunoregulation of allergic contact dermatitis. J Dermatol. 2004; 31: 264-70
48. Girolomoni G, Pastore S. The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2001; 45: 25-32
49. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pita O, Chinni LM, Gianneti A, Girolomoni G, Pastore S. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107: 871-7
50. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. Immunol Today. 1998; 19: 37-44
51. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensititvity. Immunol Today. 1998; 19: 37-44
52. Grabbe S, Steinert M, Mahnke K, Schwartz A, Luger TA, Schwarz T. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice: evidence that not the antigenic compound but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. J Clin Invest. 1996; 98: 1158-1164

53. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 1998; 19: 359-361

54. Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. J Invest Dermatol. 1995; 104: 3-6

55. Grewe M, Gyufko K, Schöpf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon γ in atopic eczema. Lancet. 1994; 343: 25-26

56. Grewe M, Walther S, Gyufko K, Czech W, Schöpf E, Krutmann J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. J Invest Dermatol. 1995; 105: 407-410

57. Gueniche A, Viac J, Lizard G, Charveron M, Schmitt D. Effect of nickel on the activation state of normal human keratinocytes through interleukin 1 and intercellular adhesion molecule 1 expression. Br J Dermatol. 1994; 131: 250-256

58. Han GW, Iwatsuki K, Inoue M, Matsui T, Nishibu A, Akiba H, Kaneko F. Interleukin-15 is not a constitutive cytokine in the epidermis, but is inducible in culture or inflammatory conditions. Acta Dermatol Venerol. 1999; 79: 37-40

59. Handley J, Todd D, Dolan O, Mc Master D, Walsh M, Allen G, Burrows D. Long-lasting allergic patch test reactions to nickel sulphate: analysis by nickel quantification and immunocytochemistry. Contact Dermatitis. 1996; 34: 101-5

60. Hanifin JM, Chan SC. Monocyte phosphodiesterase abnormalities and dysregulation of lymphocyte function in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 1995; 105: 84S-8S

61. Heufler C, Topar G, Grasserger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, Namen AE, Schuler G. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. J Exp Med. 1993; 178: 1109-1114

62. Himmelrich H, Para-Lopez C, Tacchini-Cottier F, Louis JA, Launois P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with Leishmania major down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. J Immunol. 1998; 161: 6156-6163

63. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. J Exp Med. 1998; 188: 1859-1866

64. Hochrein H, O´Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, Shortman K. Interleukin (IL) -4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. J Exp Med. 2000; 192: 823-834

65. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O´Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993; 260: 547-549

66. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Allergen-binding activity of gamma-E, gamma-G and gamma-A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody. J Immunol. 1967; 98: 490-501

67. IUIS/WHO subcommittee on chemokine nomenclature, corresponding author Thorpe R. Chemokine/ chemokine receptor nomenclature. Cytokine. 2003; 21: 48-49

68. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. J Immunol. 2003; 171: 61-8

69. Johansson C, Eshagi H, Linder MT, Jakobson E, Scheynius A. Positive Atopy Patch Test reaction to Malassezia furfur in atopic dermatitis correlates with a T helper 2-like peripheral blood mononuclear cell response. J Invest Dermatol. 2002; 118: 1044-1051

70. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomeclature for allergy for global use: Report of the nomenclature review committee of the World Allergy Organization, October 2003. J Allergy Clin Immunol. 2004; 113: 832-836

71. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T celss convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. J Exp Med. 2002; 196: 255-60

72. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulter C, Wrzyszcz M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to

mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. Eur J Immunol. 2003; 33: 1205-14

73. Kämpfer H, Muhl H, Manderscheid M, Kalina U, Kauschat D, Pfeilschifter J, Frank S. Regulation of interleukin-18 (IL-18) expression in keratinocytes (HaCaT): implications for early wound healing. Eur Cytokine Netw. 2000; 11: 626-633
74. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature. 1996; 382: 174-177
75. Kasche A, Traidl C, Feussner I, Huss-Marp J, Ring J, Behrendt H. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances from pollen grains. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2001; 15: 106
76. Kerschenlohr K, Decard S, Przybilla B, Wollenberg A. Atopy patch test reactions show a rapid influx of inflammatory dendritic epidermal cells in patients with intrinsic atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 869-74
77. Kiekens RCM, Thepen T, Oosting AJ, Bihari IC, Van de Winkel JGJ, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knol EF. Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2001; 145: 957-965
78. Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. J Exp Med. 1990; 172: 1609-1614
79. Kraft S, Wessendorf JH, Haberstok J, Novak N, Wollenberg A, Bieber T. Enhanced expression and activity of protein-tyrosine kinases establishes a functional signaling pathway only in FcepsilonRIhigh Langerhans cells from atopic individuals. J Invest Dermatol. 2002; 119: 804-11
80. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. Costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: Application to autoimmune disease therapy. Cell. 1995; 80: 707-718
81. Kuhn U, Brand P, Willemsen J, Jonuleit H, Enk AH, van Brandwijk-Petershans R, Saloga J, Knop J, Becker D. Induction of tyrosine phosphorylation in human

MHC class II-positive antigen-presenting cells by stimulation with contact sensitizers. J Immunol. 1999; 162: 3106

82. Langeveld-Wildschut E, Thepen T, Bihari IC, van Reijsen FC, de Vries IJM, Bruijnzeel PLB, Bruijnzeel-Koomen CAFM. Evaluation of the atopy patch test and the cutaneous late phase reaction as relevant models for the study of allergic inflammation in patients with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98: 1019-1027
83. Langeveld-Wildschut EG, Bruijnzeel PLB, Mudde GC, Verslius C, Van leperen-Van Dijk AG, Bihari IC, Knol EF, Thepen T, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Van Reijsen FC. Clinical and immunologic variables in skin of patients with atopic eczema and either positive or negative atopy patch test reactions. J Allergy Clin Immunol. 2000; 105: 1008-16
84. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generationof interleukin 4 (IL-4) –producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. J Exp Med. 1990; 172: 921-929
85. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003; 361:151-160
86. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. Nat Med. 2001; 7: 114-8
87. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. Nat Med. 2001; 7: 114-8
88. Liu L, Rich BE, Inobe J, Chem W, Weiner HL. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. Int Immunol. 1998; 10: 1017-26
89. Maeda T, Hao C, Tron VA. Ultraviolet light (UV) regulation of the TNF family decoy receptors DcR2 and DCR3 in human keratinocytes. J Cut Med Surg. 2001; 5: 294-302
90. Manetti R, Parronchin P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Tinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1) –specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med. 1993; 177: 1199-1204

91. May CD. The ancestry of allergy: Being an account of the original experimental induction of hypersensitivity recognizing the contribution of Paul Portier. J Allergy Clin Immunol. 1985; 75: 485-495
92. Mediaty A, Neuber K. Total and specific serum IgE decreases with age in patients with allergic rhinitis, asthma and insect allergy but not in patients with atopic dermatitis. Immun Ageing. 2005; 2
93. Mohamadzadeh M, Muller M, Hultsch T, Enk A, Saloga J, Knop J. Enhanced expression of IL-8 in normal human keratinocytes and human keratinocyte cell line HaCaT in vitro after stimulation with contact sensitizers, tolerogens and irritants. Exp Dermtol. 1994; 3: 298-303
94. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. Nature Immunol. 2000; 1: 199-205
95. Muller G, Saloga J, Germann T, Bellinghausen I, Mohamadzadeh M, Knop J, Enk AH. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. J Clin Invest. 1994; 1799-1805
96. Müschen A, Mirmohammadsadegh A, Jarzebska-Deussen B, Abts HF, Ruzicka T, Michel G. Differential IL-10 receptor gene expression in acute versus chronic atopic eczema. Modulation by immunosuppressive drugs and cytokines in normal cultured keratinocytes. Inflamm Res. 1999; 48: 539-543
97. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tstutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev. 2001; 12: 53-72
98. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tstutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 423-474
99. Nasorri F, Sebastiani S, Mariani V, De Pita O, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A. Activation of nickel-specific CD4+ T lymphocytes in the absence of antigen-presenting cells. J Invest Dermatol. 2002; 118: 172-9
100. Nickoloff BJ, Mitra RS, Green J, Zheng XG, Shimizu Y, Thompson C, Turka LA. Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. J Immunol. 1993; 150: 2148-59
101. Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, Kochan J, Bieber T. Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell

antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2004; 114: 3464-70

102. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-γ production by IL-12 and IL-18. Curr Opin Immunol. 1998; 10: 259
103. Orteu CH, Poulter LW, Rustin MHA, Sabin CA, Salmon M, Akbar AN. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. J Immunol. 1998; 161: 1619-1629
104. Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Raganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. Immunity. 2000; 12: 27-37
105. Pastore S, Mascia F, Giustizieri ML, Gianetti A, Girolomoni G. Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2001; 45: 25-32
106. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans: preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. AM J Pathol 1990; 136: 1053-1068
107. Plitz T, Saint-Mezard P, Satho M, Herren S, Waltzinger C, de Carvalho Bittencourt M, Kosco-Vilbois MH, Chvatchko Y. IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. J Immunol. 2003; 171: 1164-71
108. Quin JZ, Bacon P, Chaturvedi V, Nickoloff BJ. Role of NF-κ-B activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-γ, Tumor Necrosis Factor-α, and Tumor Necrosis Factor-related apoptosis inducing ligand. J Invest Dermatol. 2001; 117: 898-907
109. Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E. α-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. Arch Dermatol Res. 1998; 290: 428-428
110. Reeve VE, Bosnic M, Boehm-Wilcox C, Nishimura N, Ley RD. Ultraviolet A radiation (320-400nm) protects hairless mice from immunosuppression induced by ultraviolet B radiation (280-320nm) or cis-urocanic acid. Int Arch. Allergy Immunol. 1998; 115: 316-322
111. Ring J, Abeck D, Neuber K. Atopic eczema: role of microorgansims on the skin surface. Allergy. 1992; 47: 265-9

112. Ring J, Darsow U, Gfesser M, Vieluf D. The ´atopy patch test´ in evaluating the role of aeroallergens in atopic eczema. Int Arch Allergy Immunol. 1997; 113: 379-83
113. Ring J. 1st description of an “atopic family anamnesis” in the Julio-Claudian imperial house: Augustus, Claudius, Britannicus. Hautarzt. 1985; 36: 470
114. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, De Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper and dendritic cell differentiation. Science. 1999; 283: 1183-1186
115. Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. N Engl J Med. 1999; 341: 1817-1828
116. Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, Krueger JG. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. Lab Invest. 2001; 81: 335-47
117. Ruckert R, Asadullah K, Seifert M, Budagian VM, Arnold R, Trombotto C, Paus R, Bulfone-Paus S. Inhibition of keratinocte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? J Immunol. 2000; 165: 2240-50
118. Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. Arch Derm. Res. 1999; 27: 400-404
119. Schuler T, Quin Z, Ibe S, Noben-Trauth N, Blankenstein T. T helper type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. J Exp Med. 1999; 189: 803-810
120. Schwarz T. No eczema without keratinocyte death. J Clin Invest. 2000; 106: 9-10
121. Schweitzer AN, Borrelio F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. J Immunol. 1997; 158: 2713-2722
122. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nassori F, Bianchi G, Traidl C, Sozzani S, Girolomoni G, Cavani A. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. J Immunol. 2001; 166: 996-1002
123. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middelton LA, Choi Y, Fleisher TA, Lim MS, Jaffe ES, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. Clinical, immunologic

and genetic factors of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. Blood. 1997; 89: 1341-1348

124. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. Nat Immunol. 2002; 3:673-80
125. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha4beta7 or alpha4beta1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. Eur J Immunol. 2004; 34: 1303-11
126. Sugiura K, Hiramato K, Shamoto M, Sugiura M, Hayakawa R, Kato Y, Shinzato M, Osada A, Sakamoto N, Takahashi H. Immunological cell situation in the skin of atopic model mice. JEADV. 2004; 18: 148-152
127. Swain SL, Weinberg AD, Engkish M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol. 1990; 145: 3796-806
128. Symington FW, Santos EB. Lysis of human keratinocytes by allogenic HLA class I-specific cytotoxic T cells – keratinocyte ICAM-1 (CD54) and T cell LFA-1 (CD11a/CD18) mediate enhanced lysis of IFN-γ-treated keratinocytes. J Immunol. 1991; 146: 2169-2175
129. Symington FW, Santos EB. Lysis of human keratinocytes by allogenic HLA class I-specific cytotoxic T cells. J Immunol. 1991; 146: 2169-75
130. Taams LS, van Amselfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. Transplantation. 2004; 77: 12-5
131. Taga K et al. Human interleukin-10 can directly inhibit T cell growth. Blood. 1993; 81: 2964-71
132. Tan J, Deleuran B, Gesser B, Maare H, Deleuran M, Larsen CG, Thestrup-Pedersen K. Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-derived cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-13. J Immunol. 1995; 154: 3742-52
133. Tanaka H, Derneure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T

helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. J Exp Med. 2000; 192: 405-412

134. Tanaka Y, Anan S, Yoshida H. Immunohistochemical studies in mite antigen-induced patch test sites in atopic dermatitis. J Dermatol Science. 1990; 1: 361-7

135. Teunissen MB, Koomen CW, Jansen J, De Waal Malefyt R, Schmitt E, Van den Wijngaard RM, Das PK, Bos JD. In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A341 and HaCaT fail to express IL-10 mRNA and protein. Clin Exp Immunol. 1997; 107: 213-23

136. Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, Van Wichen DF, van Reijsen FC, Mudde GC, Bruijnzeel-Koomen CA. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. J Allergy Clin Immunol. 1996; 97: 828-838

137. Todd DJ, Handley J, Metwali M, Allen GE, Burrows D. Day 4 is better than day 3 for a single patch test reading. Contact dermatitis. 1996; 34: 402-4

138. Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2002; 147: 71-9

139. Traidl C, Jugert F, Krieg T, Merk H, Hunzelmann N. Inhibition of allergic contact dermatitis to DNCB but not to oxazolone in interleukin-4-deficient mice. J Invest Dermatol. 1999; 112: 476-482

140. Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. J Immunol. 2000; 165: 3058-3064

141. Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T, Huger M, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109: 831-838

142. Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Menzel A, Jakob T, Thiel M, Ring J, Behrendt H.Impact of pollen on human health: more than allergen carriers? Int Arch Allergy Immunol. 2003; 131: 1-13

143. Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altznauer F, Simon HU, Graeve T, Noll M, Bröcker EB, Blaser K, Akdis CA. T-cell mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. J Clin Invest. 2000; 106: 25-35

144. Trautmann A, Altznauer F, Akdis M, Simon HU, Disch R, Brocker EB, Blaser K, Akdis CA. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. J Invest Dermatol. 2001; 117: 927-34

145. Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2003; 112: 480-487

146. Uter W, Ludwig A, Balda BR, Schnuch A, Pfahlberg A, Schafer T, Wichmann HE, Ring J. The prevalence of contact allergy differed between population-based and clinic-based data. J Clin Epidemiol. 2004; 57: 627-32

147. von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz JM, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are upregulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo:additional mechanisms of T cell inhibition. Blood. 2006; epub ahed of print

148. Von Bubnoff D, Koch S, Bieber T. Dendritic cells and atopic eczema/ dermatitis syndrome. Curr Opin Allergy Clin Immunology. 2003; 3: 353-8

149. Wakem P, Burns RP Jr, Ramirez F, Zlotnick D, Ferbel B, Haidaris CG, Gaspari AA. Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes. J Invest Dermatol. 2000; 114: 1085-92

150. Walsh PD, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. J Clin Invest. 2004; 114: 1398-403

151. Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie-Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. Blood. 2005; 105: 4749-51

152. Werfel T, Hentschel M, Kapp A, Renz H. Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. J Immunol. 1997; 158: 2500-5

153. Werfel T, Morita A, Grewe M, Renz H, Wahn U, Krutmann J, Kapp A. Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 1996; 107: 871-876

154. Wittmann M, Purwar R, Hartmann C, Gutzmer R, Werfel T. Human keratinocytes respond to interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases. J Invest Dermatol. 2005; 124: 1225-33

155. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. J Invest Dermatol 2002; 119: 1096-102

156. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol. 2003; 3: 199-210

157. Würtzen PA, Wissenbach M, Ipsen H, Bufe A, Arnved J, Van Neerven RJJ. Highly heterogeneous Phl p 5-specific T cells from patients with allergic rhinitis differentially recognize recombinant Phl p 5 isoallergens. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104: 115-22

158. Xu H, Heeger PS, Fairchild RL. Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity. J Immunol. 1997; 159: 4217-4226

159. Yawalkar N, Egli F, Brand CU, Pichler WJ, Braathen LR. Antigen-presenting cells and keratinocytes express interleukin-12 in allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis. 2000; 42: 18-22

160. Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. J Exp Med. 2005; 202: 541-9

161. Yoshimura S, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. Eur J Immunol. 2001; 31: 1883-1893

162. Zheng W, Flavell RA. The transcripiton factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell. 1997; 89: 587-596

V Dank

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Behrendt, der Leiterin des Zentrums Allergie und Umwelt München und Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring, dem ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München dafür, dass sie es mir ermöglicht haben, an ihren Institutionen zu promovieren.

Dieses Projekt wurde erdacht und geleitet von Frau PD Dr. C. Traidl-Hoffmann und ich hatte bei der Umsetzung maßgebliche Hilfe von Frau G. Pleyl-Wisgickl und Frau A. Rizos. Ohne die genannten drei Personen wäre die vorliegende Arbeit undenkbar gewesen. Weiterhin mitgewirkt haben Herr Dr. J Huss-Marp, Frau Dr. I. Weichenmeier und Frau C. Weil, bei denen ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Das Klima am Zentrum Allergie und Umwelt ist geprägt durch ein motiviertes Team, das sich gegenseitig unterstützt. Nur in dieser Atmosphäre konnte die Arbeit entstehen.

Mein letzter Dank ist an die drei wichtigsten „F“ im Leben gerichtet (Familie, Freunde, Freundin), die meine Arbeit mit Interesse und Verständnis drei Jahre lang begleitet haben.

Stellvertretend für sie möchte ich als stolzer Patenonkel diese Arbeit gerne Lukas Eyerich widmen.

VI Lebenslauf

Name:	Kilian Georg Eyerich
Adresse:	Königinstrasse 99 80802 München
Telefonnummer:	089/38888789
Geburtsdatum:	07. Oktober 1979
Geburtsort:	Freiburg i. Brsg.
Familienstand:	Ledig

Ausbildung:

April 2006:	Abschluss des Medizinstudiums, Gesamtnote: 1,83
Oktober 2001 – April 2006:	Studium der Humanmedizin, Klinikum Rechts der Isar, TU München
Nov. 1999 – Sept. 2001:	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Juni 1999:	Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5
1990 – 1999:	Theodor-Heuss-Gymnasium, Freiburg/ St. Georgen
1986 – 1990:	Marie-Luise-Kaschnitz-Grundschule, Bollschweil

Thema der Doktorarbeit:	**Mechanismen der allergischen Ekzemreaktion** ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt, GSF/TU München, PD C. Traidl-Hoffmann/ Prof. H. Behrendt/ Prof. J. Ring

Auslandsaufenthalte:

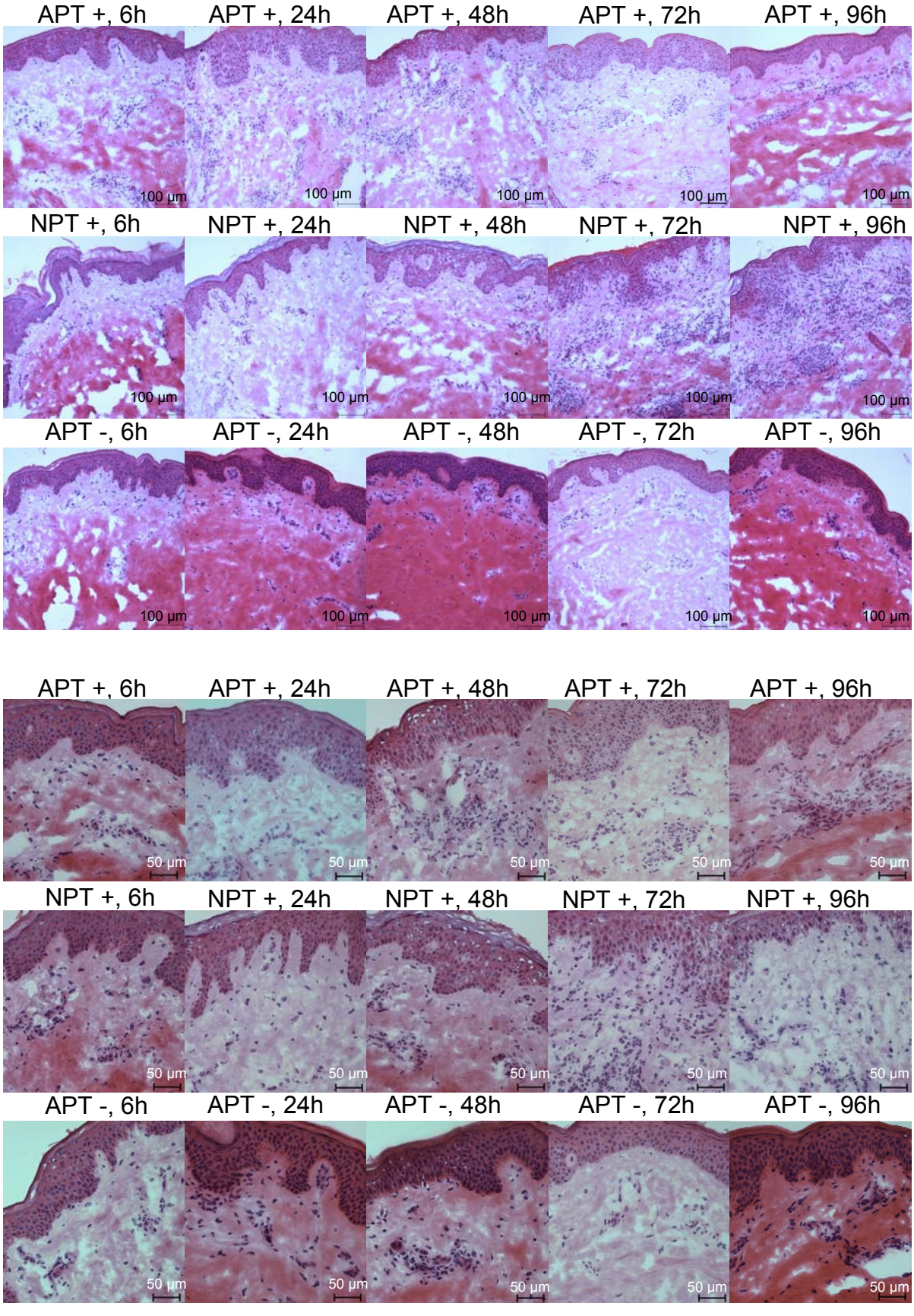
Oktober – Dezember 2005:	Abschnitt des PJ (Chirurgie), Concord Hospital, University of Sydney
Juli – August 2003:	Famulatur (Chirurgie), Hopital Bethesda, Agou-Nyogbo, Togo

Praktika und Seminare:

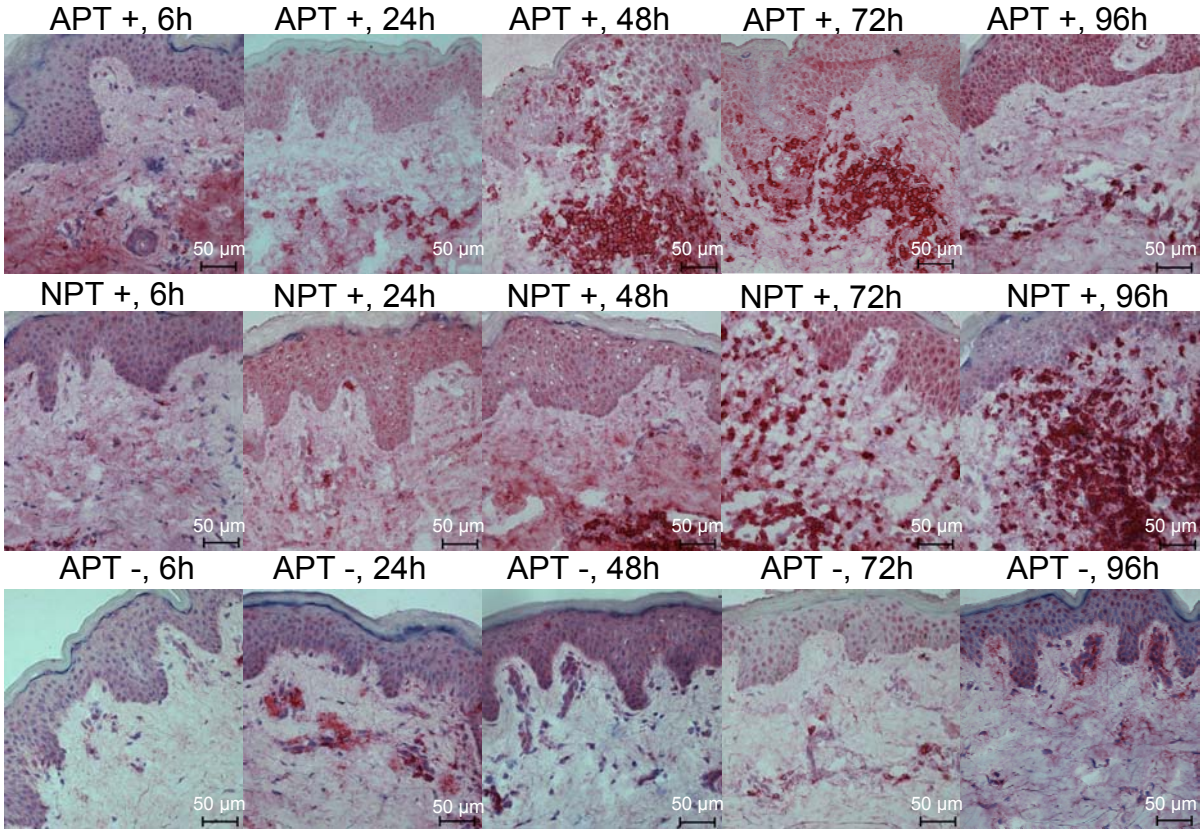
Juni 2005:	World Allergy Congress, München Organisation des Stipendiums „Med All Young“, Poster-Präsentation
Juli – August 2004:	Famulatur (Dermatologie), Klinik für Dermatologie, TU München, Prof. J. Ring
August 2003:	III. Internationales Rajka-Symposium, Rom Vortrag
Juni 2003:	XXII. Kongress der EAACI (European Academy of Allergology and clinical Immunology), Paris Stipendium “Chiron project”, Poster-Präsentation
Februar – April 2003:	Famulatur (Zelluläre Immunologie), ZAUM
Februar – März 2002:	Praxisfamulatur (HNO/ Allergologie), Praxis Dr. M. Bockmeyer, Würzburg
August 2000:	Krankenpflegepraktikum: Universitätshautklinik Freiburg, Prof. E Schöpf
März – April 2000:	Krankenpflegepraktikum: Fachklinikum für Allergologie Borkum, PD D. Vieluf

VII Anhang: Immunhistochemische Färbungen

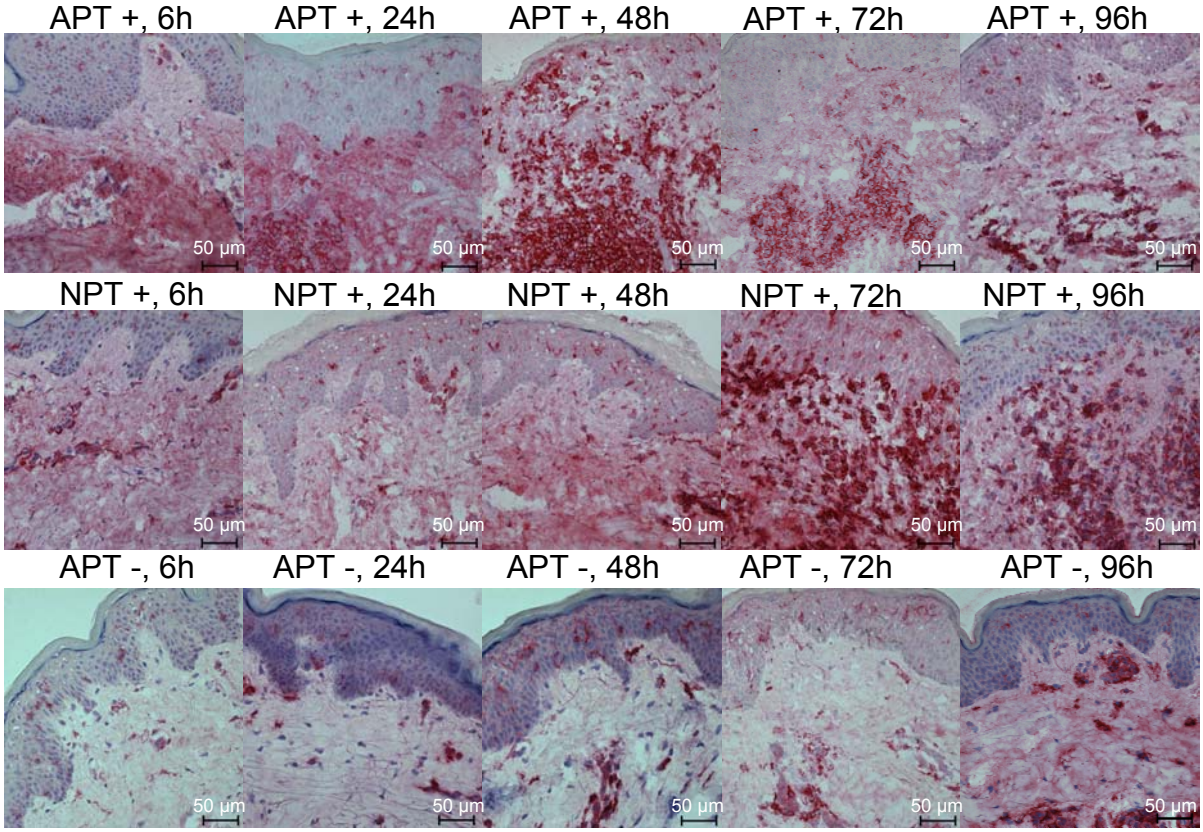
HE



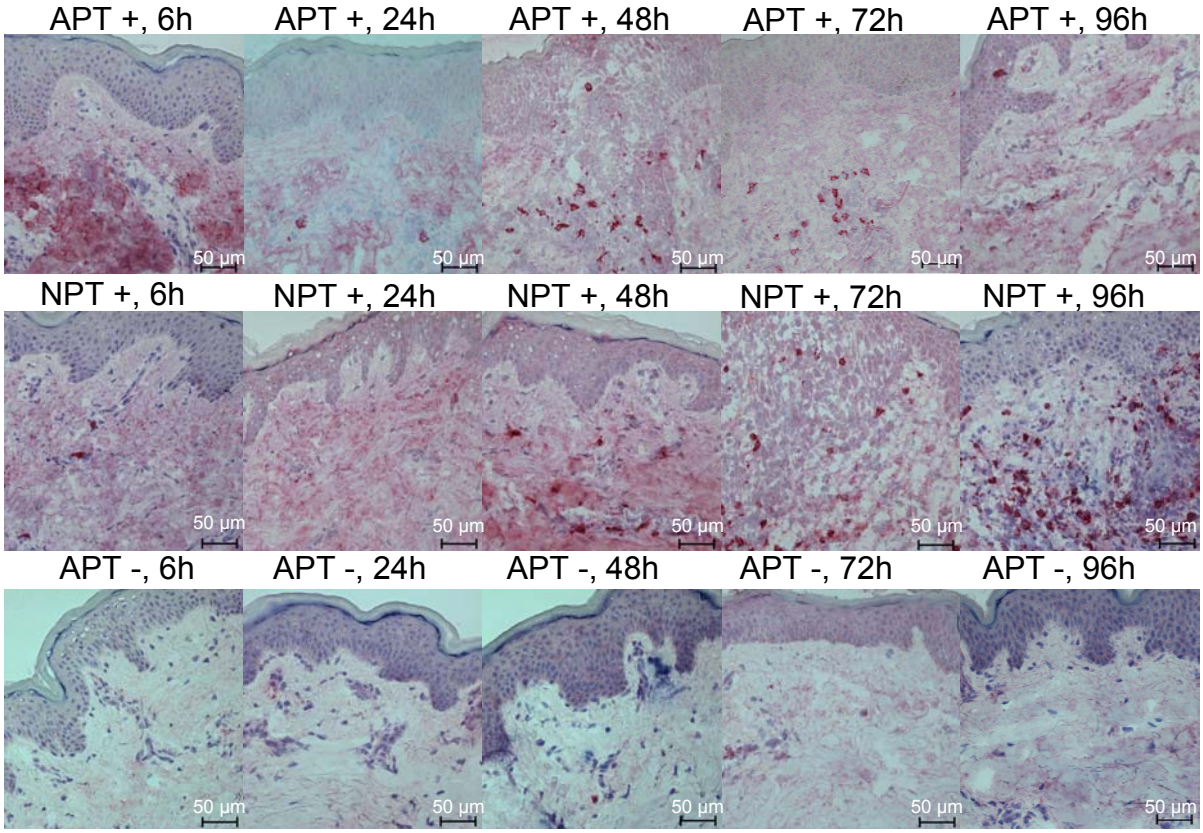
CD3


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

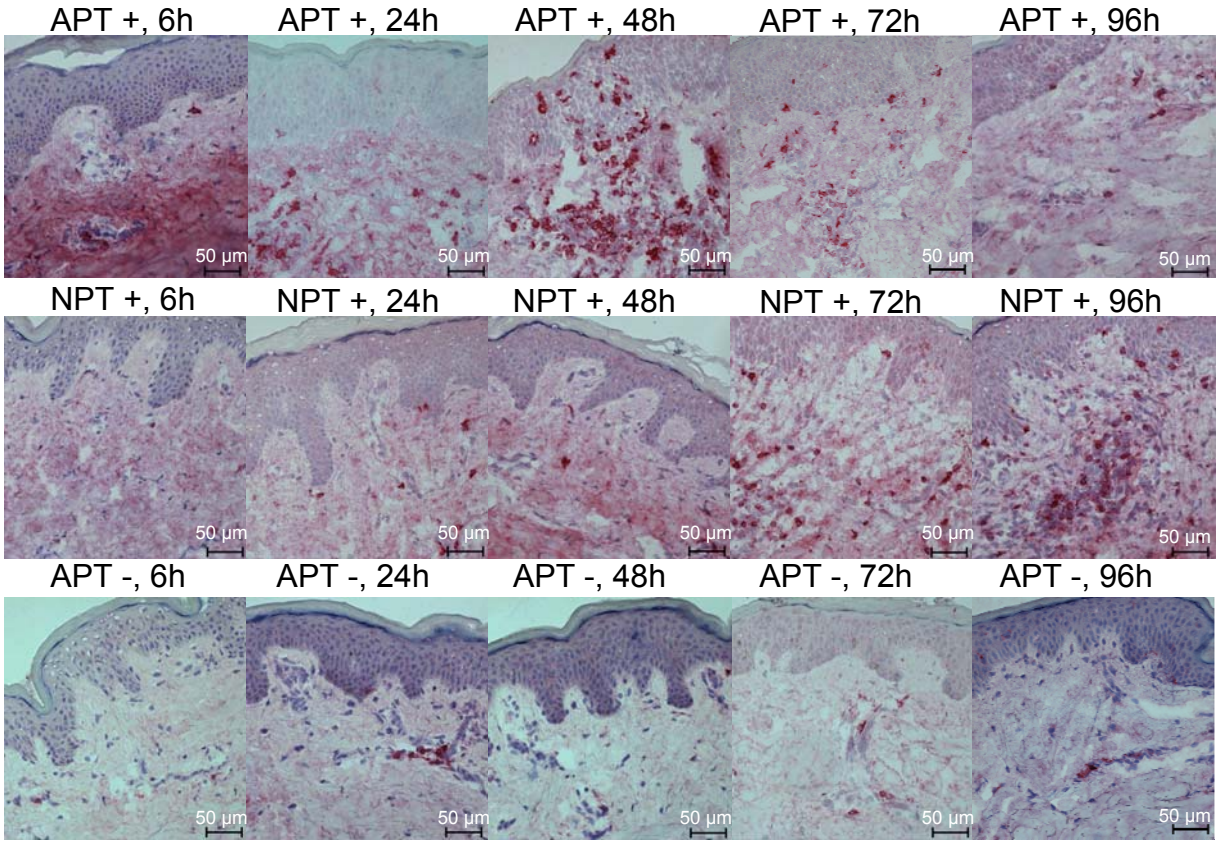
CD4


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

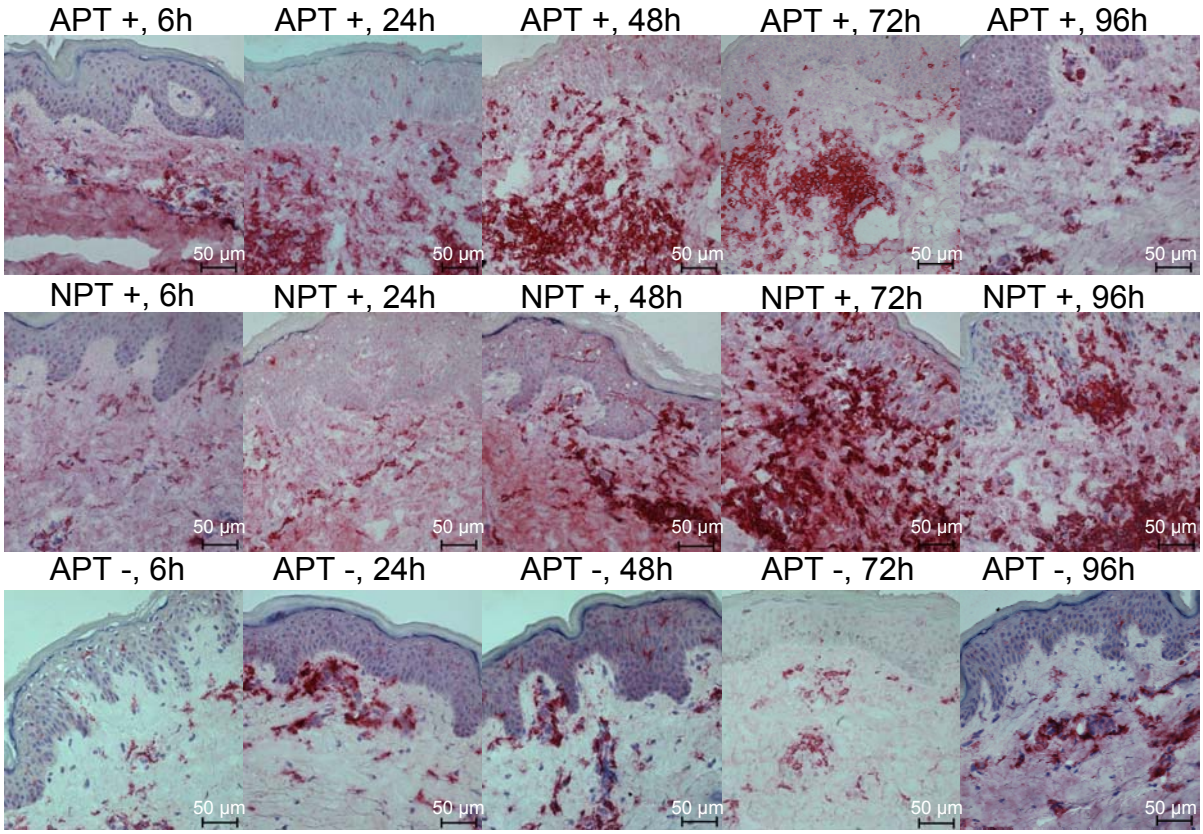
CD8


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

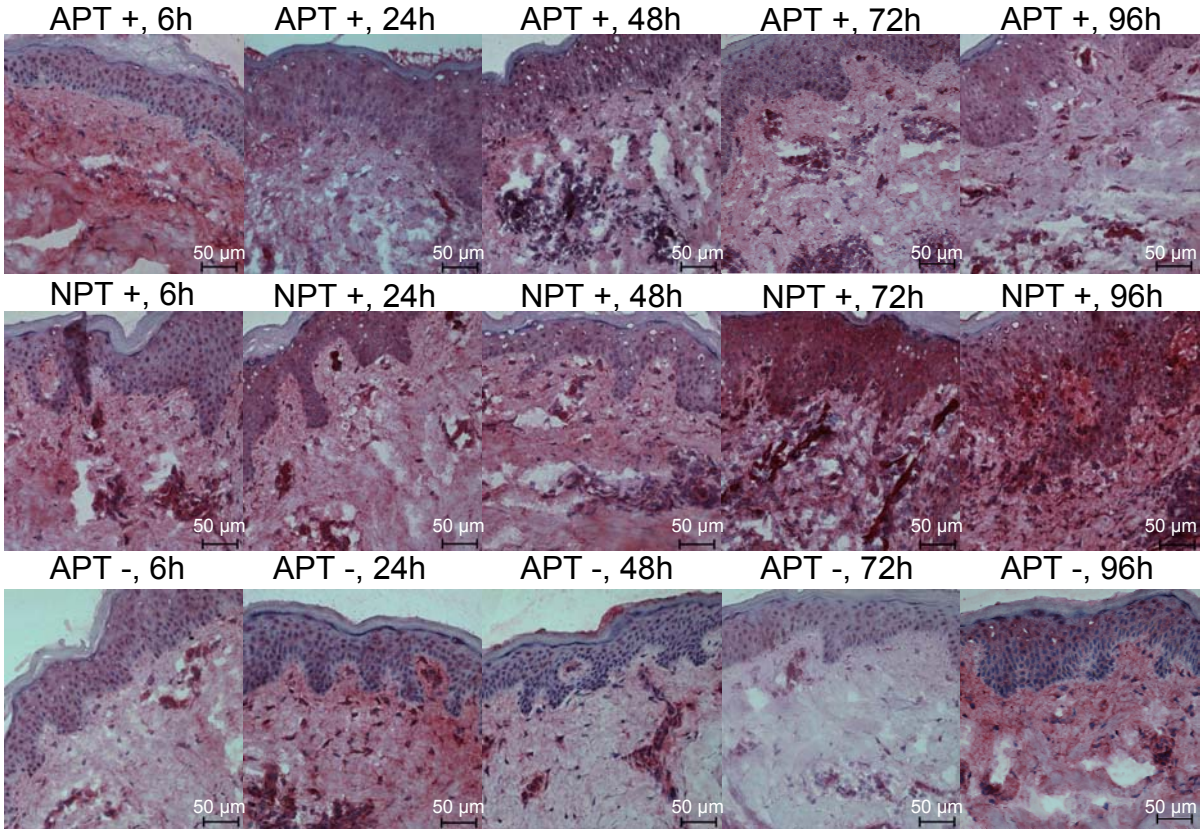
CD25


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

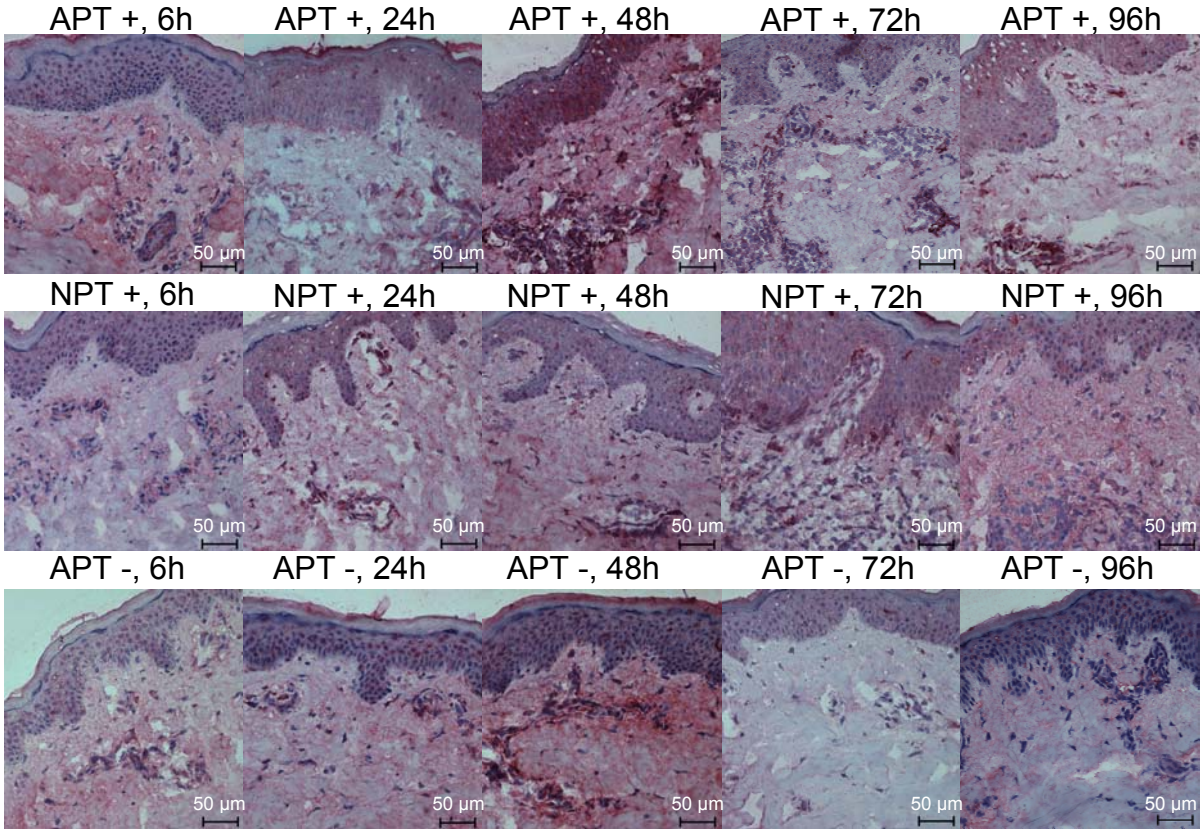
CD45RO


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

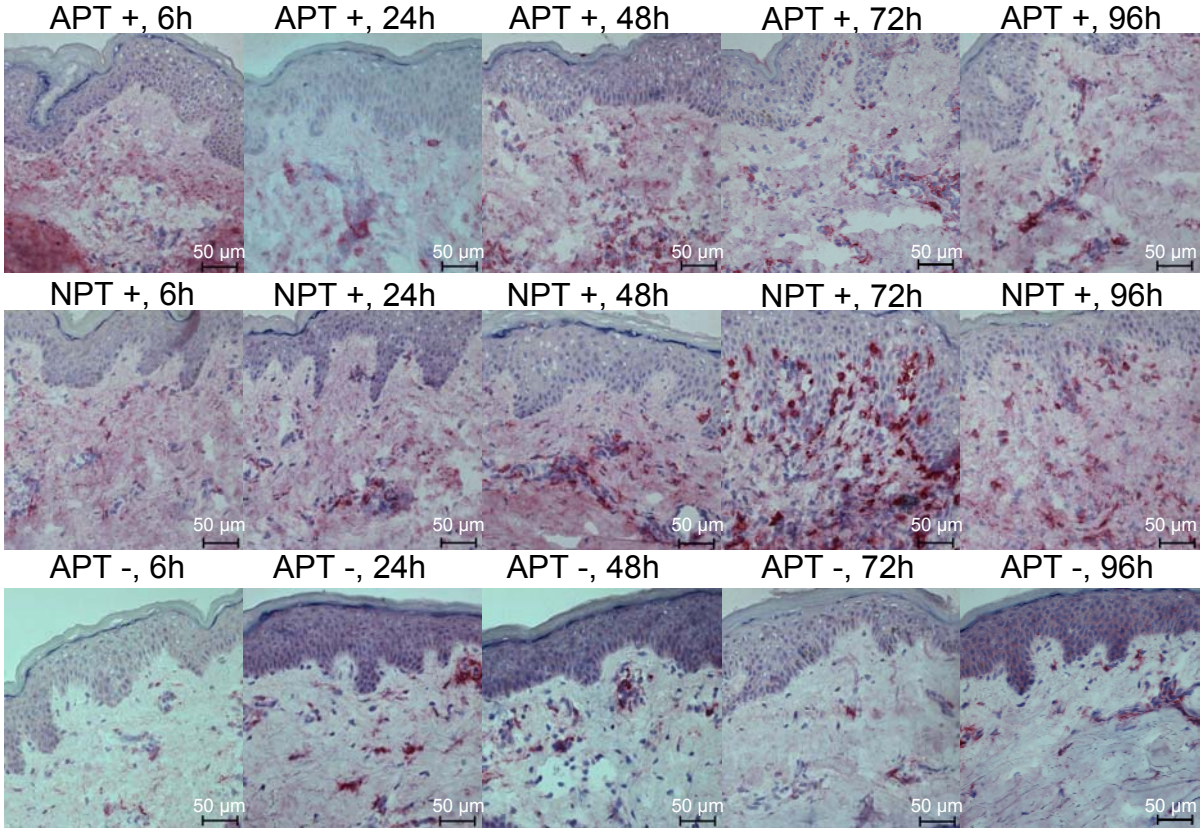
IFN-γ


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

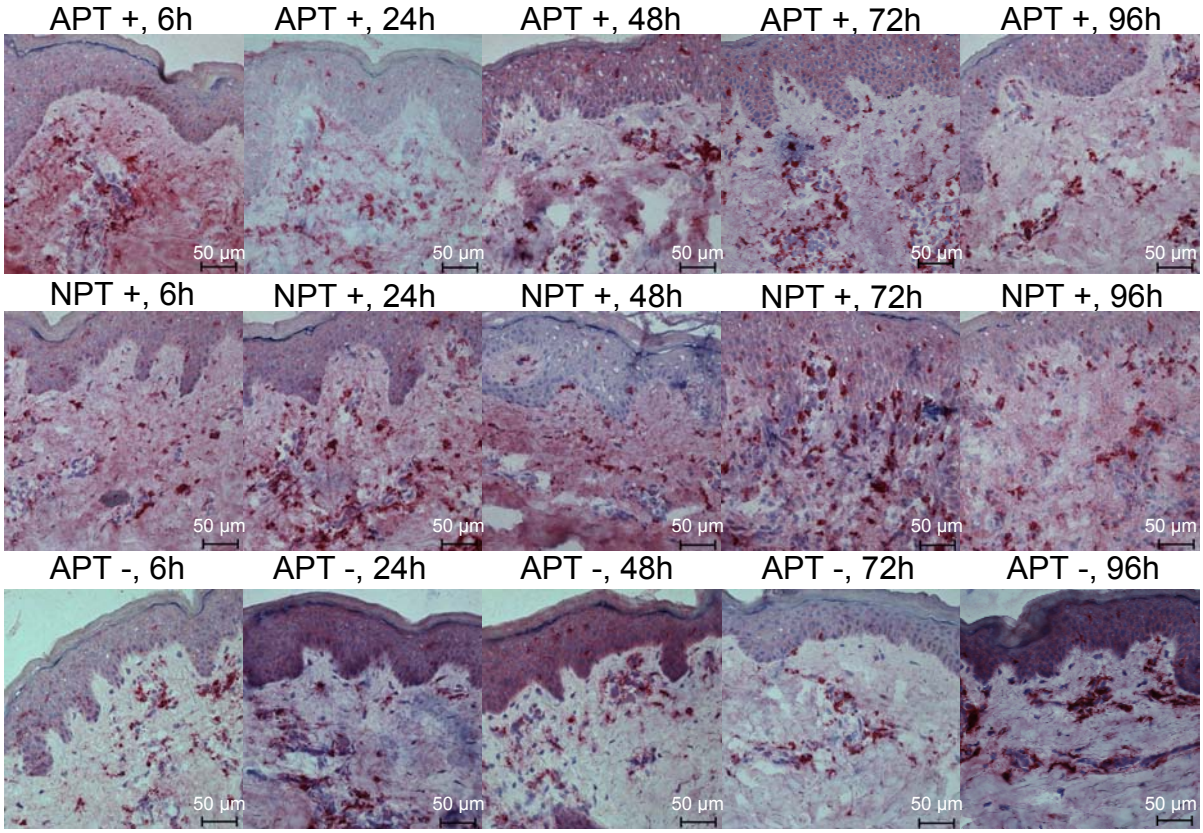
IL-5


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

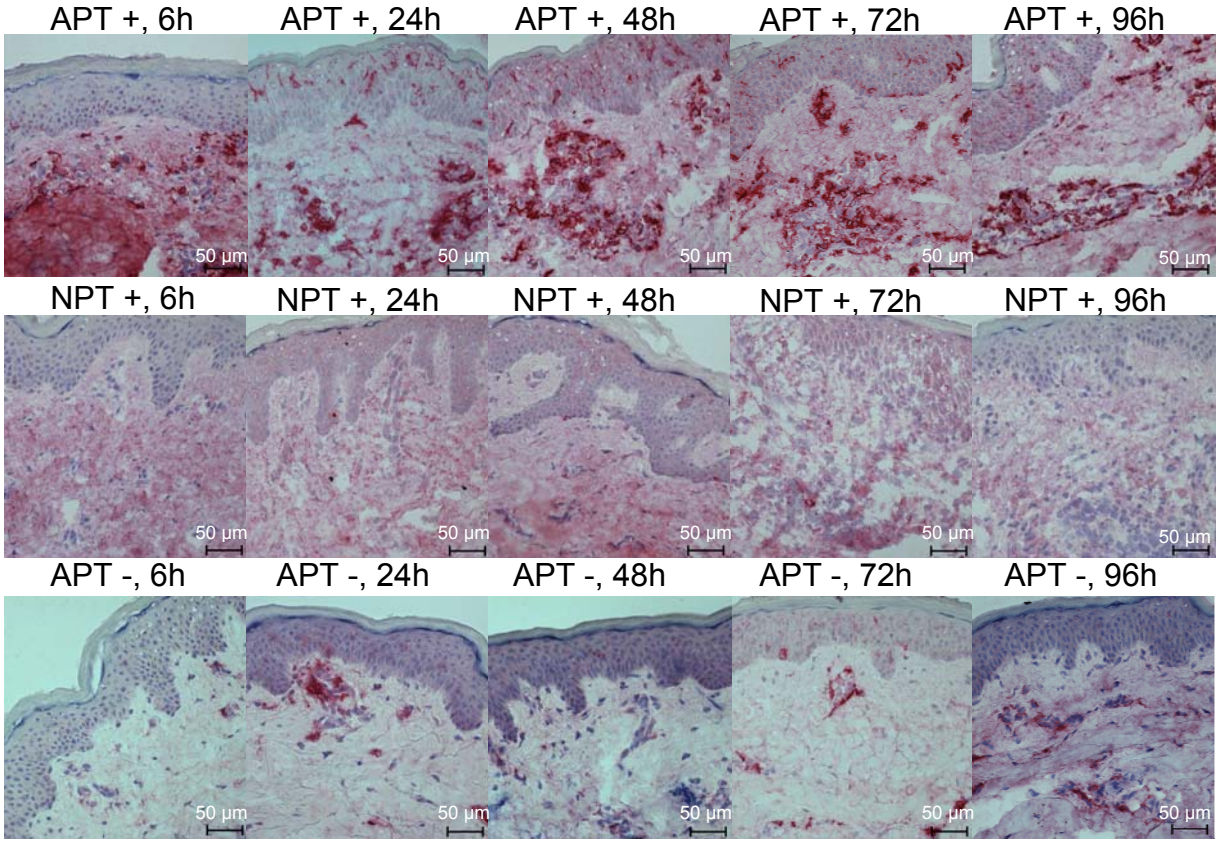
CD64


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

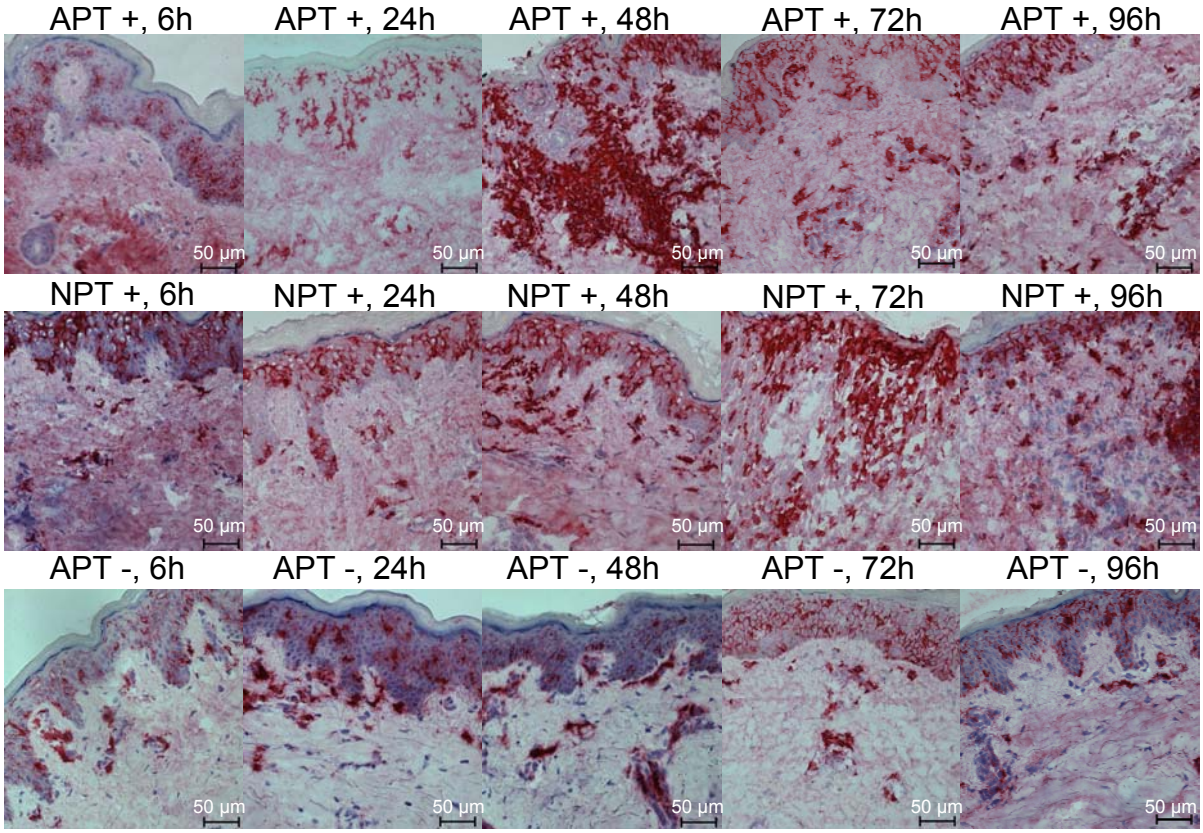
CD68


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

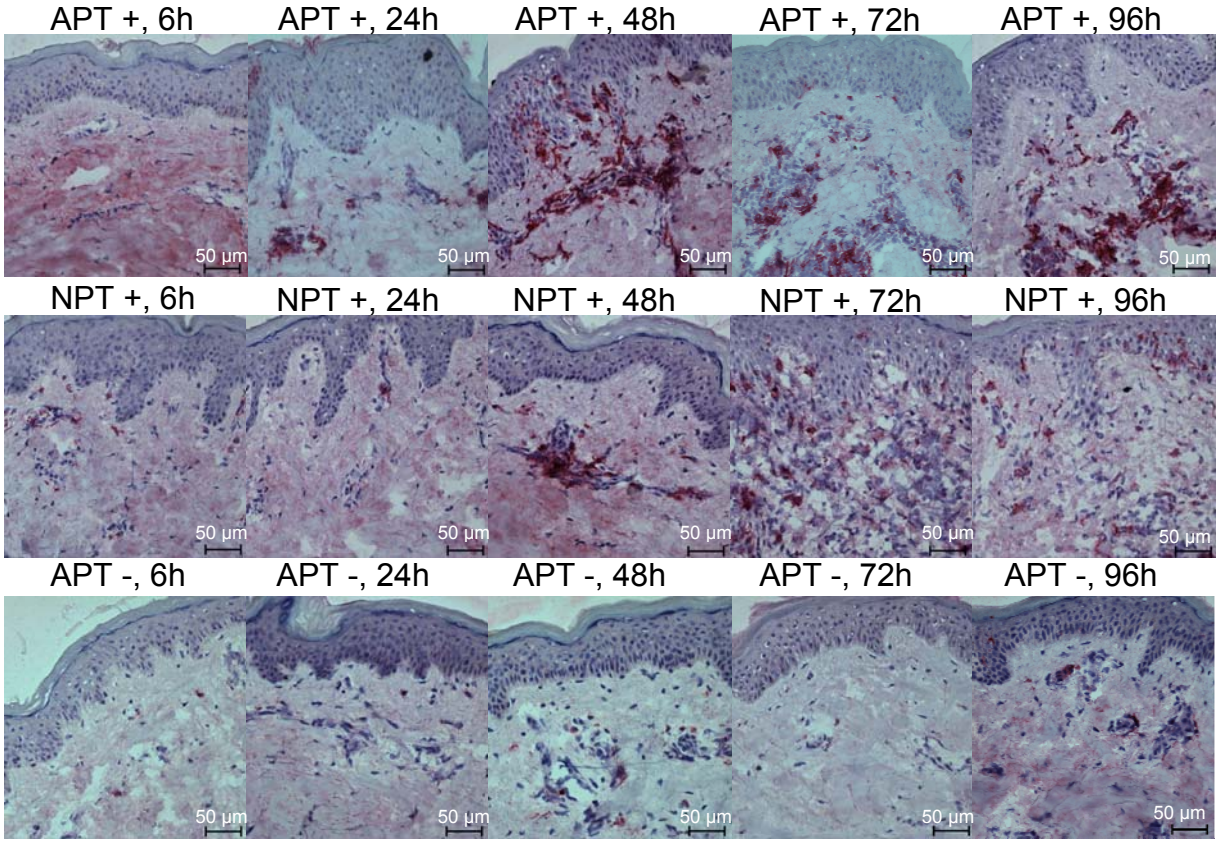
IgE


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

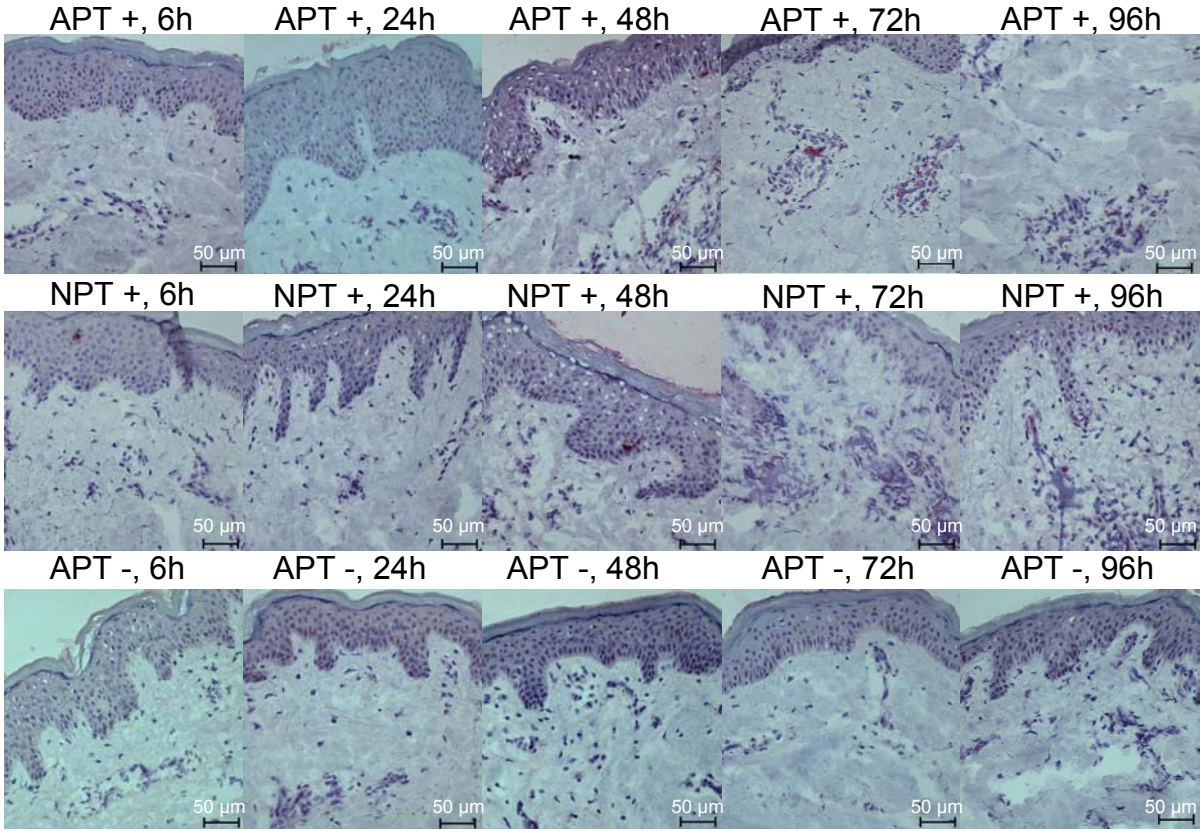
CD1a


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

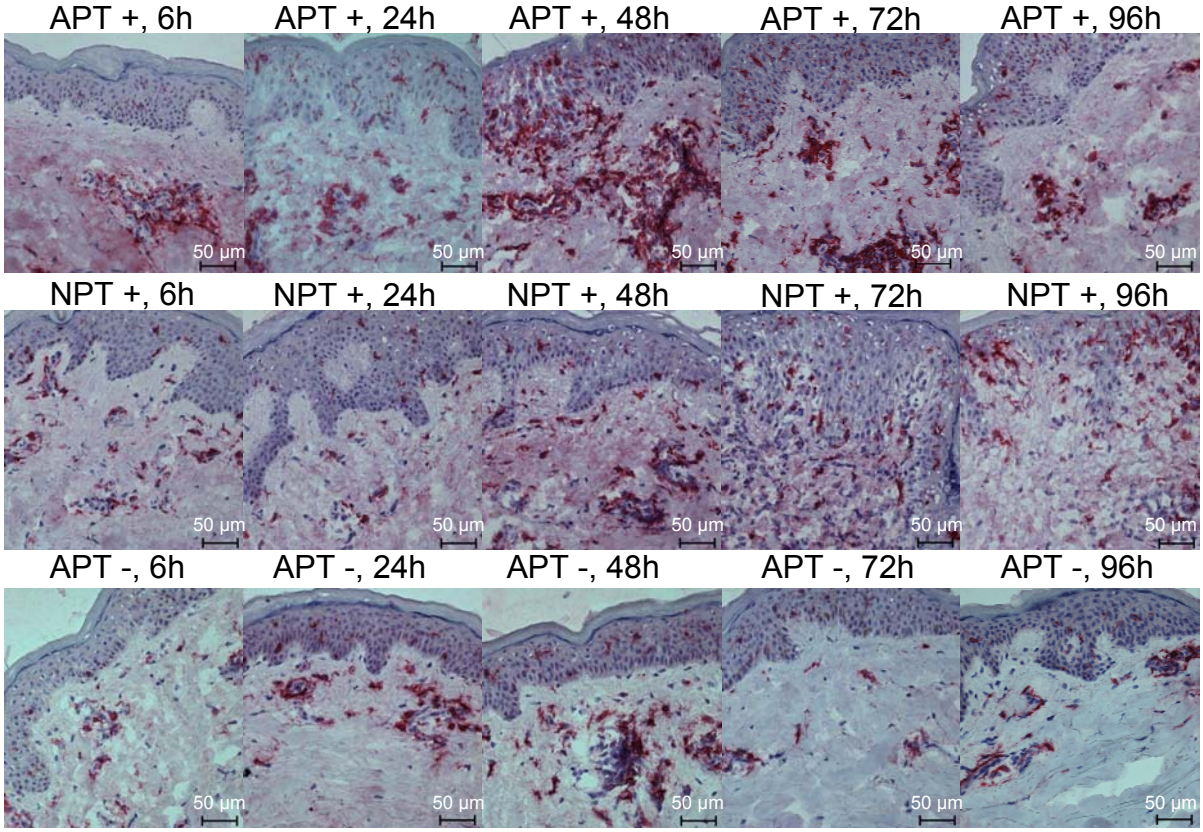
CD1b


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

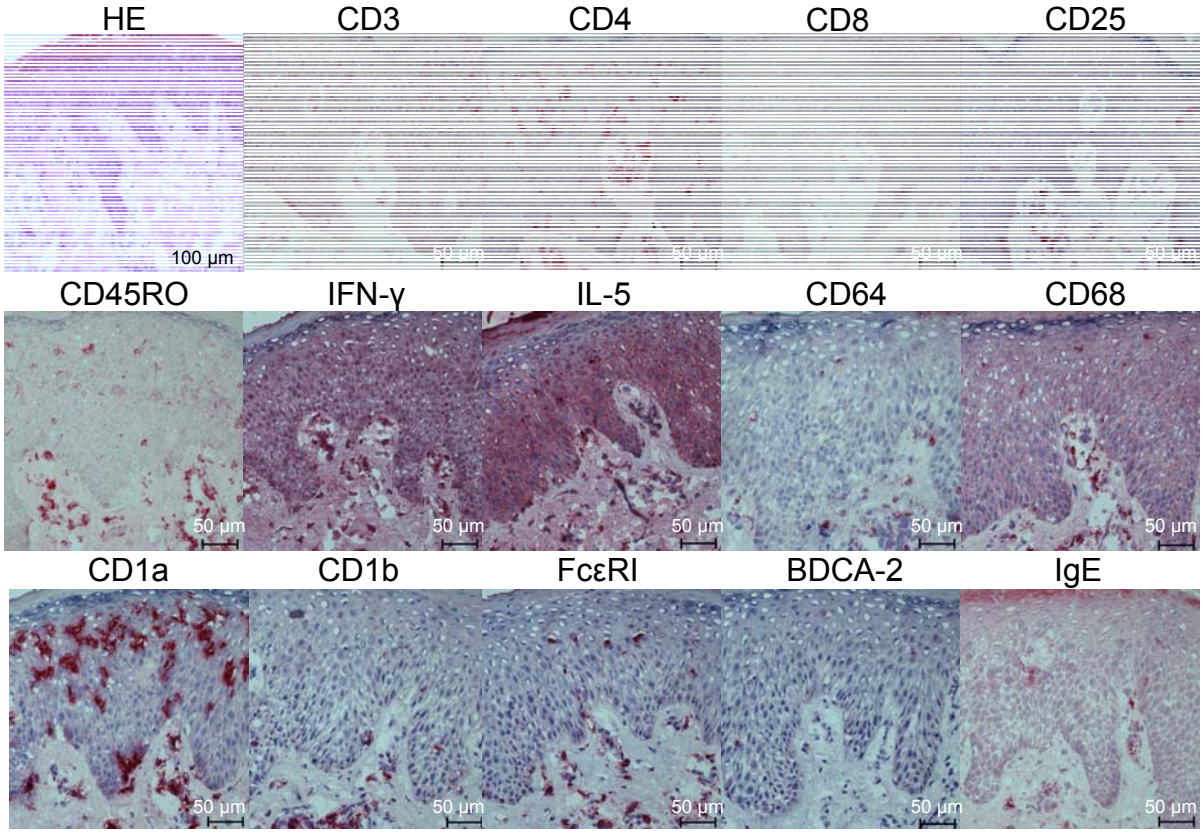
BDCA-2


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

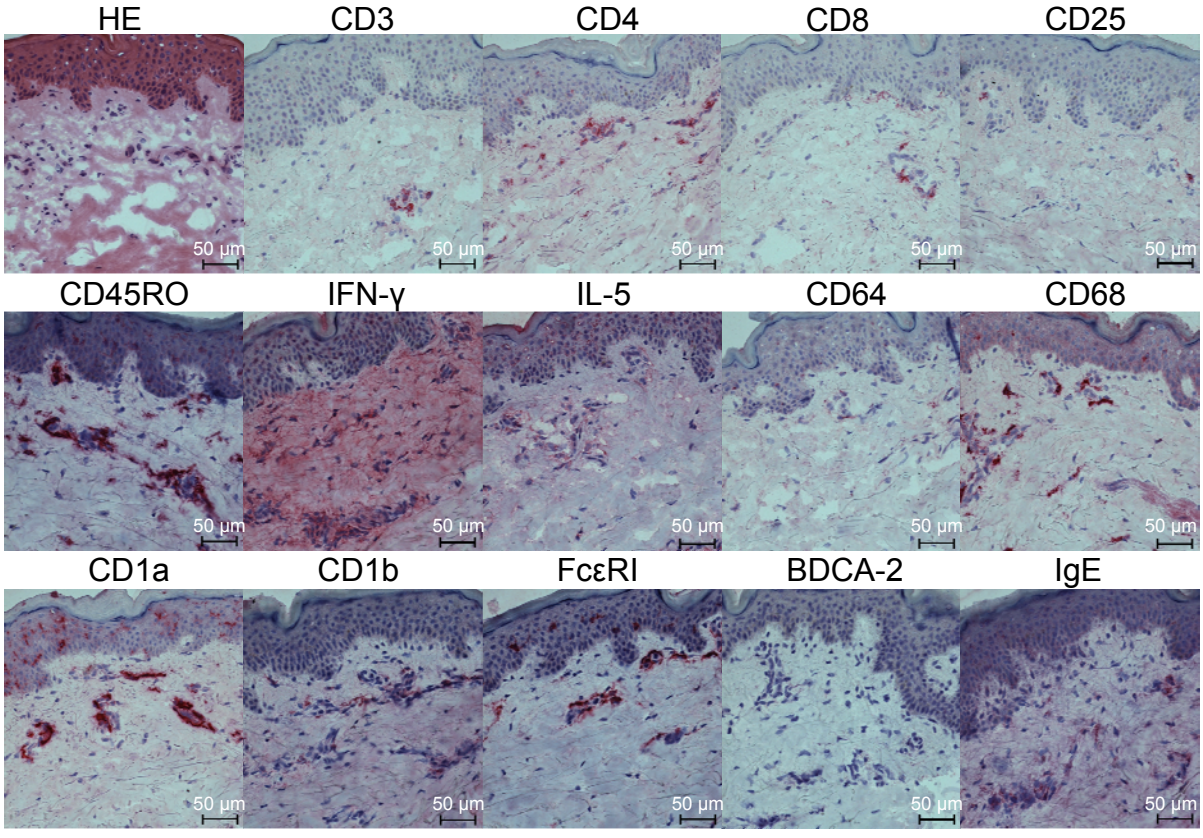
FcεRI


APT +, 6h
APT +, 24h
APT +, 48h
APT +, 72h
APT +, 96h
NPT +, 6h
NPT +, 24h
NPT +, 48h
NPT +, 72h
NPT +, 96h
APT -, 6h
APT -, 24h
APT -, 48h
APT -, 72h
APT -, 96h
50 µm

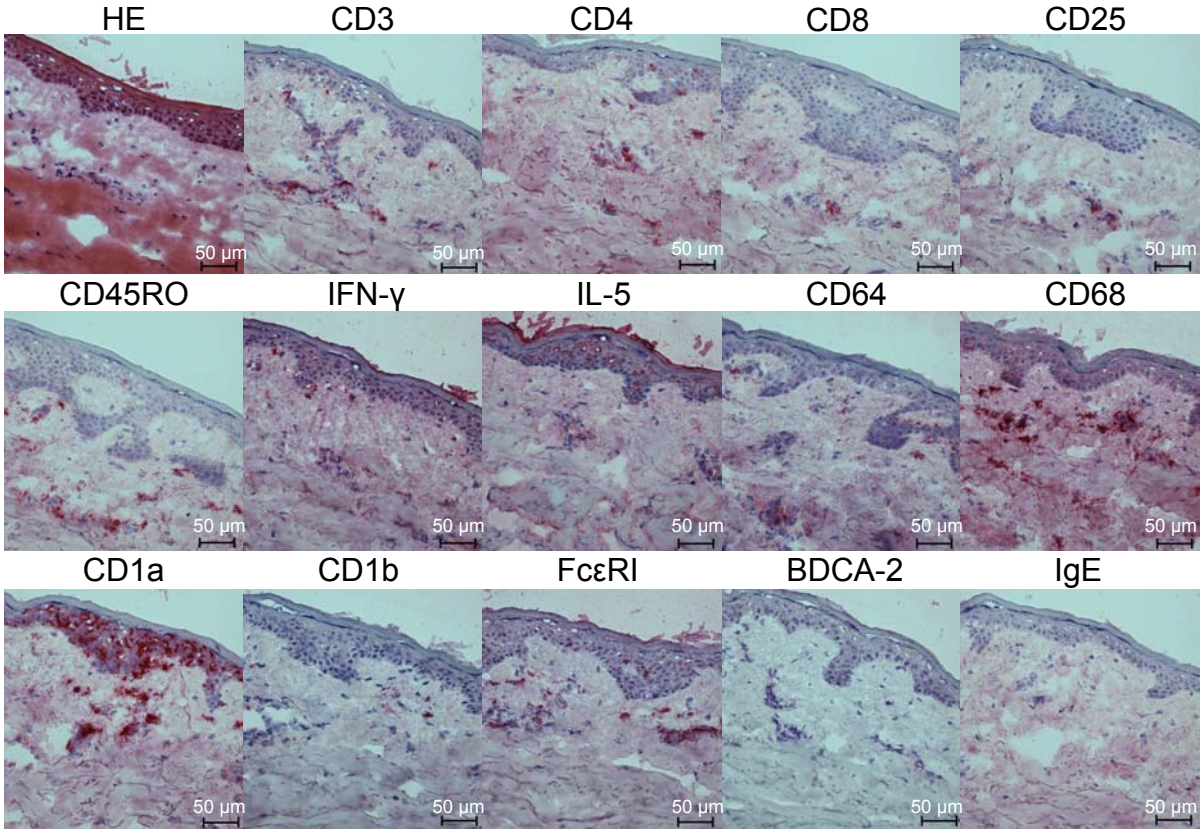
Chronisches atopisches Ekzem



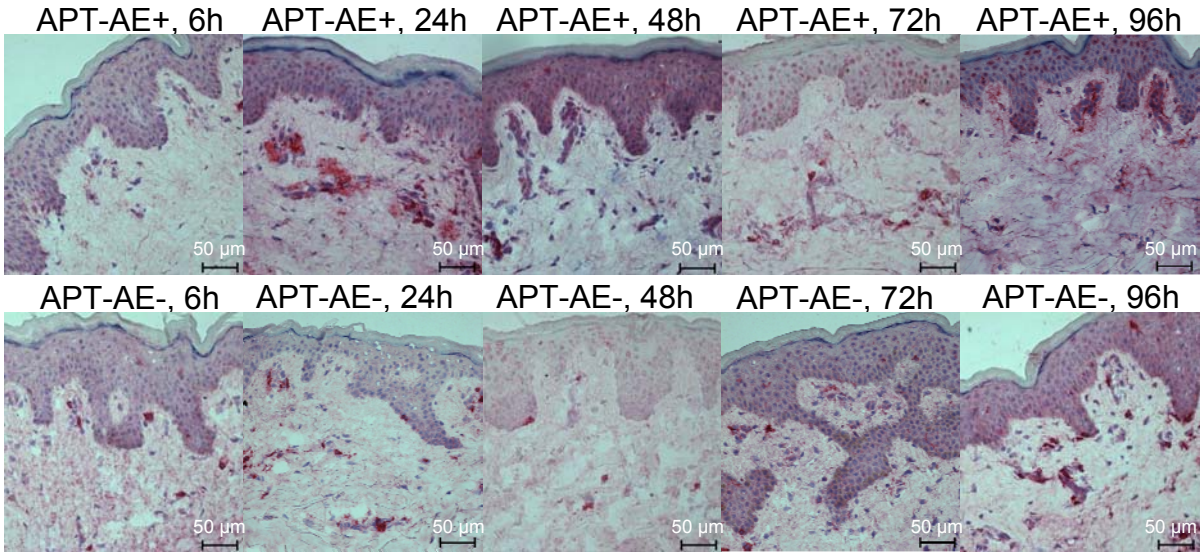
Normale Haut AE +



Normale Haut AE -



Vergleich zwischen Atopiker (AE+) und Nichtatopiker (AE-) innerhalb der Gruppe III: Färbung CD3



Daten zu den gezeigten Graphen

Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen

Nickel	CD3			CD4		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,97	0	1	1,35	0	1
24	2,25	1,1525	2	1,96	1,255	2
48	3,37	1,82	2	3,04	1,755	2
72	15,88	6,3275	2	12,05	5,105	2
96	12,37	1,0625	2	7,57	0,9475	2

APT	CD3			CD4		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,5	0	1	0,75	0	1
24	4,26	0,8225	2	3,67	2,4275	2
48	4,57	1,30614573	3	5,51	2,54819871	3
72	5,7	2,11528659	3	8,61	0,97311641	3
96	3,03	0,94	2	3,65	0,4425	2

AE+ APT-	CD3			CD4		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,41	0	1	0,47	0	1
24	0,21	0	1	1,82	0	1
48	0,62	0	1	2,43	0	1
72	0,15	0	1	0,37	0	1
96	0,72	0	1	1,32	0	1

AE- APT-	CD3			CD4		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,32	0	1	0,49	0	1
24	0,67	0	1	0,62	0	1
48	0,77	0	1	1,04	0	1
72	0,73	0	1	2,35	0	1
96	1,27	0	1	1,15	0	1

Nickel	CD8			CD1a		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,12	0	1	1,16	0	1
24	0,14	0,12	2	2,55	0,93	2
48	0,67	0,295	2	3,14	2,0075	2
72	1,03	0,265	2	4,89	0,9525	2
96	1,47	0,7225	2	2,56	0,45	2

APT	CD8			CD1a		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,13	0	1	0,69	0	1
24	0,52	0,13	2	3,49	1,1075	2
48	0,49	0,10303721	3	5,95	3,19576543	3
72	0,55	0,12057731	3	7,07	0,48683216	3
96	0,47	0,1875	2	2,33	0,2475	2

AE+ APT-	CD8			CD1a		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0	0	1	1,65	0	1
24	0,13	0	1	1,22	0	1
48	0,12	0	1	1,55	0	1
72	0,07	0	1	1,24	0	1
96	0,05	0	1	1,68	0	1

AE- APT-	CD8			CD1a		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,09	0	1	1,35	0	1
24	0,19	0	1	1,3	0	1
48	0,19	0	1	1,16	0	1
72	0,21	0	1	1,83	0	1
96	0,45	0	1	2,05	0	1

Nickel	CD25			CD45RO		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,17	0	1	1,44	0	1
24	0,58	0,475	2	2,28	2,125	2
48	0,66	0,045	2	4,92	2,2425	2
72	1,69	0,125	2	16,18	6,6225	2
96	1,41	0,3075	2	9,92	2,29	2

APT	CD25			CD45RO		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,46	0	1	0,59	0	1
24	1,08	0,91	2	7,59	1,7925	2
48	2,03	1,15415433	3	5,55	0,29352267	3
72	2,38	1,14438484	3	10,07	3,23617315	3
96	1,81	0,72	2	3,84	2,345	2

AE+ APT-	CD25			CD45RO		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,01	0	1	0,76	0	1
24	0,14	0	1	2,65	0	1
48	0,24	0	1	2,86	0	1
72	0,08	0	1	0,87	0	1
96	0,2	0	1	2,07	0	1

AE- APT-	CD25			CD45RO		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,16	0	1	0,78	0	1
24	0,33	0	1	0,36	0	1
48	0,1	0	1	2,2	0	1
72	0,11	0	1	2,25	0	1
96	0,26	0	1	2,07	0	1

Nickel	IFN			IL-5		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,63	0	1	0,09	0	1
24	1,88	0,1275	2	0,29	0,2775	2
48	1,76	0,085	2	0,14	0,015	2
72	5,91	0,6525	2	0,16	0,0525	2
96	2,66	0,9	2	0,47	0,1875	2

APT	IFN			IL-5		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,09	0	1	0,01	0	1
24	0,09	0,0875	2	1,95	1,2	2
48	1,06	0,45753567	3	1,05	0,3397056	3
72	3,05	1,43657579	3	3	0,89411347	3
96	1,22	0,3375	2	0,59	0,415	2

AE+ APT-	IFN			IL-5		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	1,01	0	1	0,06	0	1
24	0,88	0	1	0,08	0	1
48	0,32	0	1	0,13	0	1
72	0,64	0	1	0,02	0	1
96	0,14	0	1	0,03	0	1

AE- APT-	IFN			IL-5		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,44	0	1	0,2	0	1
24	0,02	0	1	0,03	0	1
48	0,81	0	1	0	0	1
72		0	0	0	0	1
96	0,33	0	1	0,21	0	1

Nickel	IgE			CD64		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0	0	1	0,03	0	1
24	0,23	0,2175	2	0,08	0,0775	2
48	0,06	0,05	2	0,48	0,4125	1
72	0,09	0,0375	2	1,89	0,5325	2
96	0,01	0,0125	2	0,65	0,0075	2

APT	IgE			CD64		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,95	0	1	0,46	0	1
24	3,92	1,495	2	0,66	0,12	2
48	3,78	1,63971034	3	1,39	0,40464662	3
72	3,36	0,69836714	3	1,1	0,122	3
96	2,48	0,1675	2	1,16	0,62	2

AE+ APT-	IgE			CD64		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,04	0	1	0,04	0	1
24	0,44	0	1	0,28	0	1
48	0,2	0	1	0,11	0	1
72	0,47	0	1	0,09	0	1
96	0,65	0	1	0,59	0	1

AE- APT-	IgE			CD64		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,08	0	1	0,05	0	1
24	0	0	1	0,37	0	1
48	0	0	1	0,88	0	1
72	0,05	0	1	0,1	0	1
96	0,1	0	1	0,24	0	1

Nickel	CD68			CD1b		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,22	0	1	0,11	0	1
24	0,55	0,0475	2	0,05	0,0375	2
48	0,91	0,6775	2	0,14	0,0575	1
72	1,94	0,4175	2	0,86	0,24	2
96	1,08	0,095	2	0,49	0,145	2

APT	CD68			CD1b		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,61	0	1	0,01	0	1
24	1,23	0,17	2	0,63	0,1825	2
48	1,3	0,80395859	3	0,62	0,391	3
72	2,61	1,27	3	0,36	0,1855	3
96	1,51	0,9	2	0,53	0,045	2

AE+ APT-	CD68			CD1b		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,43	0	1	0	0	1
24	0,51	0	1	0,01	0	1
48	0,35	0	1	0,21	0	1
72	0,62	0	1	0	0	1
96	1,2	0	1	0,24	0	1

AE- APT-	CD68			CD1b		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	1,17	0	1	0,03	0	1
24	0,5	0	1	0	0	1
48	1,08	0	1	0,1	0	1
72	0,23	0	1	0,19	0	1
96	0,85	0	1	0,21	0	1

Nickel	FcεRI		
	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,5	0	1
24	0,23	0,0575	2
48	0,58	0,225	1
72	1,35	0,2775	2
96	1,2	0,225	2

APT	FcεRI		
	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,45	0	1
24	2,23	0,435	2
48	3,02	2,396	3
72	2,48	0,093	3
96	2,65	0,9225	2

AE+ APT-	FcεRI		
	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,44	0	1
24	0,5	0	1
48	0,35	0	1
72	0,66	0	1
96	0,52	0	1

AE- APT-	FcεRI		
	Mittelwert	Stabwn	n
6	0,26	0	1
24	0,85	0	1
48	0,54	0	1
72	1,46	0	1
96	0,9	0	1

Nickel	BDCA-2 Dermis			BDCA-2 Epidermis		
	Zellen/mm²	Stabwn	n	Zellen/mm²	Stabwn	n
6	0	0	1	16	0	1
24	0,00	0,0575	2	3,00	2,94	2
48	55	48,17	1	17	11,21	1
72	103	53,38	2	0	0	2
96	24	7,39	2	17	2,134	2

APT	BDCA-2 Dermis			BDCA-2 Epidermis		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0	0	1	0	0	1
24	33,00	33,21	2	0,00	0	2
48	66	9,16	3	16	17,17	3
72	57	19,9	3	27	2,4	3
96	26	6,39	2	19	11,868	2

AE+ APT-	BDCA-2 Dermis			BDCA-2 Epidermis		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0	0	1	0	0	1
24	0	0	1	0	0	1
48	0	0	1	0	0	1
72	0	0	1	0	0	1
96	10	0	1	0	0	1

AE- APT-	BDCA-2 Dermis			BDCA-2 Epidermis		
	Mittelwert	Stabwn	n	Mittelwert	Stabwn	n
6	0	0	1	0	0	1
24	0	0	1	0	0	1
48	0	0	1	0	0	1
72	0	0	1	0	0	1
96	0	0	1	0	0	1

	APT MP/JS IFN	APT MP/JS IL-5	IFN/IL-5	Abweichung
24	0,18	0,75	0,24	0,1184127
48	0,49	0,7	0,7	0,33896082
72	1,52	4,22	0,36018957	0,30753117
96	0,88	0,17	5,17647059	1,80823529
	APT KE IFN	APT KE IL-5		
24	0,01	3,15	0,0031746	
48	1,08	0,49	2,20408163	
72	2,65	2,11	1,25592417	
96	1,56	1	1,56	
	APT WG IFN	APT WG IL-5		
48	1,61	1,51	1,06622517	
72	4,97	2,67	1,86142322	
	Ni ID IFN	Ni ID IL-5		
24	1,76	0,57	3,0877193	8,50614035
48	1,67	0,12	13,9166667	0,825
72	5,26	0,22	23,9090909	17,9090909
96	1,76	0,66	2,66666667	5,02380952
	Ni IN/ID IFN	Ni IN/ID IL-5		
24	2,01	0,1	20,1	
48	1,84	0,15	12,2666667	
72	6,57	0,11	59,7272727	
96	3,56	0,28	12,7142857	

Ttests	IFN/IL5 APT	IFN/IL5 NPT
24h	0,26302234	0,02824659
48h	0,7394176	0,00282671
72h	0,97073513	0,01281698
96h	0,35818464	0,14023719

In vitro Ekzem-Modell

Statistik: Proliferation der T-Zell-Linien, Anzahl spezifischer Klone

Kone SH	Gesamtwells	Zahl Klone	spezifisch
CD4+	240	50	12
CD8+	240	37	(4) 0
Klone ID			
CD4+	240	35	4
CD8+	240	80	2
Gesamtzahl			
CD4+	480	85	17 (20)
CD8+	480	117	4 (7)
Kreisdiagramm	395	68	17
	363	110	7

Prol-Index Linie
9,4
2,2
7
2,7

	% bereinigt	Prol.-Index Linien	PI/%
CD4+	20	8,2	0,41
CD8+	5,982905983	2,45	0,4095

Prol.-Index 2-3	PI 3-5	PI 5-7	PI 7-10	PI 10-20	PI >20
2	3	4	3	3	1

Koinkubationen von T-Zell-Klonen und autologen Keratinozyten

Klon	% Änderung PI +EBV	Abweichung	n	% Änderung PI alone	Abweichung	n
SH4.3.1	150,58	14,93	4			
SH4.3.2	76,33	28,86	3	244,6	66,19	2
SH4.3.8	123,01	37,32	2	239,056	12,56	3
SH4.3.15	88,16	10,57	3	16,15	0,2	2
SH4.3.16	63,98	8,5	5			
SH4.3.17	83,88	31,51	3	14,99	3,33	3
SH4.3.20	45,12	28,47	2	23,4	18,27	2
SH4.3.27	105,82	6,66	2	25,58	3,26	2
SH8.3.7	21,88	0	1			
ID8.2	184,54	16,38	3	10,64	5,64	2
ID8.20	42,6	0	1	39,71	0	1

	% Änderung IL-4 +EBV	Abweichung	n	% Änderung IL-4 alone	Abweichung	n
SH4.3.1	71,8	0	1			
SH4.3.2	74,6	19,68	2			
SH4.3.8	71,7	17,88	2	105,3	35,41	2
SH4.3.15	23,8	0	1	6,7	0	1
SH4.3.16	113,4	8,78	2			
SH4.3.17	82	32,12	2	16,1	3,54	2
SH4.3.20						
SH4.3.27						
SH8.3.7						
ID8.2	57	17,3	3	15,3	0	1
ID8.20						

VII Anhang: Daten zu den gezeigten Graphen

	% Änderung IL-10 +EBV	Abweichung	n	% Änderung IL-10 alone	Abweichung	n
SH4.3.1	6,9	0	1			
SH4.3.2	5,8	0	1			
SH4.3.8	42,3	13,97	2	42,7	10,8	2
SH4.3.15	318,5	0	1	143,2	0	1
SH4.3.16	29,8	27,13				
SH4.3.17	34,3	0	1	13,1	0	1
SH4.3.20						
SH4.3.27						
SH8.3.7						
ID8.2	20,3	1,23	3			
ID8.20						

	% Änderung IFN +EBV	Abweichung	n	% Änderung IFN alone	Abweichung	n
SH4.3.1	168,1	0	1			
SH4.3.2	163,5	46,7	2			
SH4.3.8				133,6	0	1
SH4.3.15	117,7	32,81	2	32,9	15,77	2
SH4.3.16	327,9	46,51	2			
SH4.3.17	105,6	24,27	2	15,9	11,23	2
SH4.3.20						
SH4.3.27						
SH8.3.7						
ID8.2	99,8	11	3	172	0	1
ID8.20						

Abhängigkeiten von verschiedenen Keratinozyten-Konditionen

Klon	PI in %		Klon	PI in %		Klon	PI in %	
	Keras IFN	Keras BFA		Keras IFN	Keras BFA			
SH4.3.16	28,88151	52,935512	SH4.3.20	41,6947	97,680322	ID8.20	40,08458	33,03028
	22,3918	32,71398		73,58886	90,873855		42,63176	58,98508
Mittelwert	25,63665	42,824746	Mittelwert	57,64178	94,277088	Mittelwert	41,35817	46,00768
SEM	IFN	BFA	SEM	IFN	BFA	SEM	1,273594	12,9774
	3,244853	10,110766		15,94708	3,4032338			
		Ttest			Ttest			
		0,2469354			0,153702			

Klon	IL-10 Produktion		
	Kontrolle	Keras IFN	Keras BFA
SH4.3.16	500	0	140
	493	0	100
Mittelwert	496,5	0	120
SEM	0,705	0	24,169
SH4.3.20	3608	1517	2607
	2941	1451	
Mittelwert	3274,5	1484	

SEM	333,5	33	
ID8.20	371	192	237
	450	224	239
Mittelwert	410,5	208	238
SEM	39,5	16	1

Klon SH4.3.1 PI in %		IL-10 Produktion			**Klon SH4.3.16 PI in %**		IL-10 Produktion		
ohne IFN	mit IFN	Kontr.	IL-10 w/o	IL-10 IFN	w/o IFN	IFN	Kontr.	IL-10 w/o	IL-10 IFN
132,05715	127,5307	819	75	162	59,41304	65,657302	779	14	8
118,50663	112,5738	1001	51	29	71,92909	75,817241	708	14	100
124,30603	131,3374	960	172	123	89,54728	86,346931	824	9	13
130,84208	133,3519	Mittelwert						172	55
Mittelwert	Mittelwert	926,67	99,33333	104,6667	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert		
126,42797	126,1985	in %	10,71942	11,29496	73,62981	75,940492	770,333	52,25	40,3333
SEM w/o	SEM IFN		SEM w/o	SEM IFN	SEM w/o	SEM IFN	in %	6,78278	5,23583
								SEM	SEM
2,7205503	4,069612		28,00149	11,25833	8,699005	5,9725814		w/o	IFN
		in %	5,12765	1,525314				39,5	11,75
				IL-10					IL-10
5 Tage	11 Tage	Kontr.	IL-10 5d	11d	5 Tage	11 Tage	Kontr.	IL-10 5d	11d
137,43826	140,004	818	123	523	89,59912	88,432016	779	173	149
104,99436	140,5711	1001	29	162	68,50345	53,290001	708	13	53
167,97318	146,0102		172	257	71,52243	81,77567	824	9	3,5
Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert			Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert		
136,80193	142,1951	909,5	108	314	76,54167	74,499229	743,5	65	68,5
SEM 5d	SEM 11d	in %	11,87466	34,52446	SEM 5d	SEM 11d	in %	8,74243	9,21318
									SEM
8,8146744	1,733831		SEM 5d	SEM 11d	5,218291	1,9215218		SEM 5d	11d
			14,14508	76,78759				47,3427	42,0022
		in %	1,555259	8,442835			in %	6,36755	5,64926
								IL-10	IL-10
autolog	heterolog	Kontrolle	IL-10 aut	IL-10 het	autolog	heterolog	Kontrolle	aut	het
106,46437	128,1477	0	0	0	59,41304	98,477443	287	38	84
124,01316	131,3062	0	0	0	79,74754	108,60288		65	73
128,81922	*60,47857*		0	0	71,92909	95,272176		101	85
132,86223	131,3076	Mittelwert			Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert		
Mittelwert	Mittelwert	0	0	0	70,36322	100,78417	287	68	80,6667
128,56487	130,2538	in %	0	0	SEM aut	SEM het	in %	23,6934	79,868
Stabwn	Stabwn								SEM
aut	het		SEM aut	SEM het	3,613071	0,9252809		SEM 5d	11d
3,6170888	1,489268		0	0				18,1865	0,28868
							in %	6,33677	0,28582