

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und  
Chemische Lebensmitteltechnologie

Untersuchungen zum interzellulären Diskurs von  
Keratinocyten und T-Zellen in einem Allergen-spezifischen *in vitro* Modell der  
Effektorphase der allergischen Kontaktdermatitis und  
des akuten atopischen Ekzems

Stefanie Christine Förster

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. Werner Back
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) Harun Parlar
	2. apl. Prof. Dr. Angelika Görg
	3. Priv.-Doz. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 17.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 26.03.2008 angenommen.

Diese Arbeit wurde am Zentrum Allergie und Umwelt der Technischen Universität München (Leitung Prof. Heidrun Behrendt) in der Arbeitsgruppe Zelluläre Immunologie unter der Leitung von PD Dr.med Claudia Traidl-Hoffmann angefertigt und finanziert durch das Helmholtz Zentrum München. Prof. Harun Parlar betreute diese Arbeit als Doktorvater.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	6
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1. ENTSTEHUNG VON IMMUNREAKTIONEN IN DER HAUT .....	8
1.2 T-ZELL SUBPOPULATIONEN .....	12
1.3 DAS EKZEM .....	16
1.3.1 Nomenklatur ekzematöser Hauterkrankungen .....	16
1.3.2 Die allergische Kontaktdermatitis .....	18
1.3.2.1 Rolle von APZ in der allergischen Kontaktdermatitis .....	19
1.3.2.2 Rolle von T-Zellen in der allergischen Kontaktdermatitis .....	20
1.3.3 Das atopische Ekzem .....	24
1.3.3.1 Vorherrschende T <sub>H</sub> 2 Immunitätslage bei Patienten .....	24
1.3.3.2 Chemokine in der Pathogenese des atopischen Ekzems .....	25
1.3.3.3 Genetische Assoziationen beim Ekzem .....	26
1.3.3.4 Besiedelung der Haut mit Mikroorganismen .....	27
1.3.3.5 Autoantikörper in der Pathogenese des atopischen Ekzems .....	28
1.3.3.6 Rolle von APZ in der Pathogenese des atopischen Ekzems .....	28
1.3.3.7 Rolle von T-Zellen im atopischen Ekzem .....	29
1.4 INTERAKTIONEN ZWISCHEN KERATINOZYTEN UND T-ZELLEN IN EKZEMATÖSEN REAKTIONEN .....	31
1.4.1 Effekte von T-Zellen und T-Zell Mediatoren auf Keratinozyten .....	32
1.4.2 Effekte von Keratinozyten auf T-Zellen .....	34
<b>2. ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
3.1 MATERIAL .....	39
3.1.1 Substanzen .....	39
3.1.2 Verbrauchsmaterial .....	40
3.1.3 Geräte .....	41
3.2 MEDIEN .....	42
3.3 METHODEN .....	45
3.3.1 Probandencharakterisierung .....	45
3.3.2 Generierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) .....	46
3.3.2.1 Generierung von Dendritischen Zellen (DZ) .....	46
3.3.2.2 Immortalisierung von B-Zellen durch EBV-Transformation .....	46
3.3.3 Isolierung von humanen Allergen-spezifischen T-Zellklonen .....	47
3.3.4 Kultivierung primärer humaner Keratinozyten .....	52
3.3.5 Keratinozyten – T-Zell – APZ - Ko-Kultur .....	54
3.3.5.1 Allergen für die Ko-Kultur .....	54
3.3.5.2 T-Zellklone für die Ko-Kultur .....	54
3.3.5.3 Antigen-präsentierende Zellen für die Ko-Kultur .....	55

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.3.5.4 Keratinozyten für die Ko-Kultur -----	56
3.3.5.5 Auswertung der Kontroll- bzw. Ko-Kultur -----	58
<b>4. ERGEBNISSE -----</b>	<b>59</b>
4.1 ETABLIERUNG EINES <i>IN VITRO</i> EKZEM MODELLS -----	59
4.1.1 <i>Isolierung und Charakterisierung der T-Zellklone</i> -----	59
4.1.1.1 Isolierung und Charakterisierung von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen -----	59
4.1.1.2 Charakterisierung der isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklone -----	61
4.1.2 <i>Aktivierung humaner Keratinozyten mit IFN-<math>\gamma</math></i> -----	64
4.2 INTERAKTIONEN VON KERATINOZYTEN UND T-ZELLEN-----	65
4.3 EINFLUSS VON KERATINOZYTEN AUF DIE PROLIFERATION VON ALLERGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN -----	68
4.3.1 <i>Keratinozyten modulieren die Proliferation von Nickel-spezifischen T-Zellen im in vitro Modell der allergischen Kontaktdermatitis</i> -----	68
4.3.1.1 Autologe Keratinozyten hemmen die Proliferation in der Mehrheit der untersuchten Nickel-spezifischen T-Zellklone -----	68
4.3.1.2 Autologe Keratinozyten induzieren die Proliferation in einer Minderheit der untersuchten Nickel-spezifischen T-Zellklone -----	70
4.3.1.3 Nachweis der Proliferations-Induktion mittels CFSE Färbung -----	71
4.3.1.4 Autologe Keratinozyten modulieren die Proliferation von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ Klonen-----	73
4.3.2 <i>Keratinozyten modulieren die Proliferation von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen im in vitro Modell des atopischen Ekzems</i> -----	74
4.4 KERATINOZYTEN MODULIEREN DIE ZYTOKINPRODUKTION VON T-EFFEKTORZELLEN-----	76
4.4.1 <i>Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion Nickel-spezifischer T-Zellklone</i> -----	76
4.4.1.1 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion Proliferations-gehemmter Nickel-spezifischer T-Zellklone	76
4.4.1.2 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion Proliferations-induzierter Nickel-spezifischer T-Zellklone	78
4.4.1.3 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ Klonen -----	79
4.4.2 <i>Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion von Phl p 1- spezifischen T-Zellklonen</i> -----	80
4.5 MECHANISMUS DER KERATINOZYTEN-INDUZIERTEN MODULATION VON T-ZELL EFFEKTORFUNKTIONEN	82
4.5.1 <i>Die Modulation von T-Zell Effektorfunktionen ist unabhängig von der Art der Allergenpräsentation</i> -----	82
4.5.2 <i>Der Differenzierungsgrad der Keratinozyten hat keinen Einfluss auf deren modulierende Wirkung</i>	83
4.5.3 <i>Autologe und heterologe Keratinozyten beeinflussen T-Zell Effektor-funktionen</i> -----	84
4.5.4 <i>Fixierung von Keratinozyten mit Paraformaldehyd</i> -----	86
4.5.5 <i>Identifizierung löslicher Faktoren als Mediatoren der Modulation</i> -----	88
4.5.5.1 Zellfreie Keratinozyten-Überständen induzieren die T-Zellproliferation und hemmen die Zytokinproduktion -----	88
4.5.5.2 Keratinozyten hemmen im Zwei-Kammersystem die Effektorfunktionen von T-Zellen-----	92
<b>5. DISKUSSION -----</b>	<b>95</b>
5.1 CHARAKTERISIERUNG DER GENERIERTEN T-ZELLKLONE -----	96
5.1.1 <i>Charakterisierung der Nickel-spezifischen T-Zellklone</i> -----	96
5.1.2 <i>Charakterisierung der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone</i> -----	98

# INHALTSVERZEICHNIS

---

5.2 MORPHOLOGISCHE INTERAKTION ZWISCHEN KERATINOZYTEN UND T-ZELLEN-----	99
5.3 KERATINOZYTEN MODULIEREN DIE ALLERGEN-SPEZIFISCHE T-ZELL PROLIFERATION UND ZYTOKINPRODUKTION -----	101
5.3.1 <i>Keratinozyten modulieren die Effektorfunktionen von Nickel-spezifischen T-Zellklonen</i> -----	101
5.3.1.1 Proliferations-gehemmte Nickel-spezifische T-Zellklone-----	101
5.3.1.2 Proliferations-induzierte Nickel-spezifische T-Zellklone -----	102
5.3.1.3 Nickel-spezifische „Selfpresenter“ T-Zellklone -----	103
5.3.2 <i>Keratinozyten modulieren die Effektorfunktionen von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen</i> -----	104
5.3.3 <i>Bedeutung der Modulation von T-Zell Effektorfunktionen durch Keratinozyten im allergischen Ekzem</i> -----	106
5.3.3.1 Rolle der gehemmten bzw. induzierten T-Zell Proliferation-----	106
5.3.3.2 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IFN- $\gamma$ Modulation in T-Zellen -----	106
5.3.3.3 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IL-4 Modulation in T-Zellen -----	107
5.3.3.4 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IL-10 Modulation in T-Zellen-----	108
5.3.3.5 Rolle der Modulation von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ T-Zellen in der allergischen Kontaktdermatitis -----	109
5.4 MECHANISMEN DER MODULATION VON T-ZELL EFFEKTORFUNKTIONEN DURCH KERATINOZYTEN -----	110
5.5 <i>Mögliche Mediatoren zur Modulation von T-Zell Effektorfunktionen</i> -----	112
5.5.1 Keratinozyten–Mediatoren, die die T-Zell Proliferation beeinflussen -----	114
5.5.1 Keratinozyten – Mediatoren, die die T-Zell Zytokinproduktion beeinflussen -----	115
5.6 HYPOTHESE ZUR ROLLE VON KERATINOZYTEN IN DER EKZEM REAKTION-----	117
5.6.1 <i>Rolle von Keratinozyten in der allergischen Kontaktdermatitis</i> -----	117
5.6.1 <i>Rolle von Keratinozyten im atopischen Ekzem</i> -----	119
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG-----</b>	<b>122</b>
<b>7. SUMMARY-----</b>	<b>124</b>
LITERATURSVERZEICHNIS -----	126
DANK -----	141
LEBENS LAUF -----	142
ANHANG -----	143
DATEN-ANHANG -----	145

VORTRÄGE

*Keratinocytes act as immune modulators in the effector phase of acute allergic reactions*

Stefanie Foerster, Kilian Eyerich, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergo Journal 1/2005, p 29-47, V10

**17. Mainzer Allergie Workshop, Mainz, 11-12.03.2005**

*Crosstalk of keratinocytes and T cells during eczematous skin reactions*

Stefanie Foerster, Kilian Eyerich, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergo Journal, 3/2007, p V55

**19. Mainzer Allergie Workshop, Mainz, 16-17.03.2007**

*Interactions of the key players in eczematous skin reactions: Keratinocytes and T cells*

Stefanie Foerster, Kilian Eyerich, Johannes Ring, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergy Abstract Book No. 1618, Late breaking Abstract Session

**XXVI EAACI Congress, Göteborg, Schweden, 9.-13.06.2007**

POSTER

*Keratinocytes act as immune modulators in the effector phase of acute allergic reactions*

Stefanie Foerster, Kilian Eyerich, Ingrid Weichenmeier, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

Abstract Book, No.

**World Allergy Congress ,WAC, München, 26.06.-01.07.2005**

*Crosstalk of keratinocytes and T cells during eczematous skin reactions*

Stefanie Foerster, Kilian Eyerich, Johannes Ring, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

**5<sup>th</sup> EAACI-Ga2len-Davos Meeting, Switzerland, 01.-04.02.2007**

*Crosstalk of keratinocytes and T cells during eczematous skin reactions*

S. Foerster, K. Eyerich, J. Ring, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann

Experimental Dermatology, March 2007-Vol. 16, Issue3 page193-295 Poster 001

XXXIV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V 8.-10.03.2007, Freiburg

ORIGINALIA

*Altered, but not diminished specific T cell response in chronic mucocutaneous candidiasis patients*

Kilian Eyerich, Rombold Stephanie, Stefanie Foerster, Heidrun Behrendt, Heidelore Hofmann, Johannes Ring, Claudia Traidl-Hoffmann

**Arch Dermatol Res 2007, published online: 25.10.2007**

*Pollen Grains Induce a Rapid and Biphasic Eczematous Immune Response in Atopic Eczema Patients*

Kilian Eyerich, Johannes Huss-Marp, Ulf Darsow, Andreas Wollenberg, Stefanie Foerster, Johannes Ring, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

**Int Arch Allergy Immunol 2008;145:213–223**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AB/AM</b>	Antibiotika/Antimykotika Lösung	<b>IDEC</b>	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>IFN</b>	Interferon
<b>ACD</b>	Allergische Kontaktdermatitis	<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>AE</b>	Atopisches Ekzem	<b>IL</b>	Interleukin
<b>AICD</b>	Aktivierungs-induzierter Zelltod	<b>IL-1RA</b>	IL-1 Rezeptor Antagonist
<b>APE</b>	Wässriger Pollenextrakt	<b>K</b>	Keratinozyt, unstimuliert
<b>APZ</b>	Antigen-präsentierende Zelle	<b>K IFN</b>	Keratinozyt, IFN- $\gamma$ stimuliert
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin	<b>KP</b>	Keratinozyten Passage
<b>CCL</b>	C-Chemokin-Ligand	<b>LFA</b>	
<b>CCR</b>	Chemokin-Rezeptor	<b>LZ</b>	Langerhans Zelle
<b>CD</b>	„cluster of differentiation“	<b>MHC</b>	„major histocompatibility complex“
<b>CDR</b>	Komplementaritäts-bestimmende Region	<b>MTP</b>	Mikrotiterplatte
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein-Succinimidylester	<b>MZ</b>	Mastzelle
<b>CLA</b>	Kutanes Lymphozyten Antigen	<b>M<math>\Phi</math></b>	Makrophage
<b>Cpm</b>	„counts per minute“	<b>p</b>	prozentuale Änderung
<b>CXCL</b>	CX-Chemokin-Ligand	<b>PBMZ</b>	Periphere Blut Mononukleäre Zellen
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PFA</b>	Para-Formaldehyd
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate buffered saline	<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>DZ</b>	Dendritische Zelle	<b>Phl p 1</b>	Phleum pratense p1
<b>EAE</b>	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis	<b>PI</b>	Proliferationsindex
<b>EBV B-Zelle</b>	EBV- transformierte B-Zelle	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>SEA,B,C,D</b>	Staphylokokken Enterotoxin A, B, C, D
<b>EGF</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor	<b>STAT</b>	„Signal Transducers and Activators of Transcription“
<b>ELISA</b>	„enzyme-linked immunosorbent assay“	<b>T<sub>H</sub></b>	T-Helferzelle
<b>FACS</b>	„fluorescent associated cell sorter“	<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>Fc<math>\epsilon</math>RI</b>	Hochaffiner IgE Rezeptor	<b>Tr1</b>	T regulatorische Zelle von Typ1
<b>Fi-Medium</b>	„first incubation“ Medium	<b>TRAIL</b>	„Tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand“
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum	<b>Treg</b>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorische T-Zelle
<b>FOXP3</b>	„forkhead box“ P3	<b>TSLP</b>	thymale stroma lymphopoetin
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten, Makrophagen stimulierender Faktor	<b>TZR</b>	T-Zellrezeptor
<b>HBSS</b>	„Hank's balanced salt solution“	<b>U</b>	„unit“
<b>HEV</b>	Venole mit hohem Endothel	<b>VCAM</b>	Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül
<b>HLA</b>	Humanes Leukozyten Antigen	<b>VLA</b>	„very late activation antigen“
<b>HU-DZ</b>	Humanes DZ Medium	<b><math>\alpha</math>-Nac</b>	„alpha-nascent polypeptide-associated complex“
<b>ICAM</b>	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül		



## 1. Einleitung

Der Begriff „Allergie“ ist in modernen Gesellschaften durchaus kein Fremdwort mehr. In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem dramatischen Anstieg von allergischen Sensibilisierungen und Reaktionen, deren Behandlung die europäische Union jährlich ca. 25 Milliarden Euro kostet [23]. Aufgrund dieser hohen Kosten und des weiterhin bestehenden Forschungsbedarfs stellen allergische Erkrankungen eine große gesundheitliche Herausforderung unserer Zeit dar. Unter „Allergie“ versteht man eine verstärkte, spezifische Abwehrreaktion des Immunsystems gegenüber an sich harmlosen Substanzen. Von dieser Überempfindlichkeitsreaktion sind hauptsächlich die Grenzflächen unseres Organismus, die Haut und die Schleimhäute, betroffen, was sich u.a. in allergischer Rhinokonjunktivitis, Urtikaria, Nahrungsmittel- und Arzneimittelallergien, allergischer Kontaktdermatitis und atopischem Ekzem äußert. Allergie ist keine Bagatellerkrankung, da sie einen chronischen/rezidivierenden Verlauf nehmen und in Form des anaphylaktischen Schocks sogar tödlich enden kann und zudem die Lebensqualität des Einzelnen erheblich beeinträchtigt. Die Mechanismen, die zur Ausprägung einer Allergie führen (Sensibilisierung), wurden in den letzten Jahren sehr stark beforscht und sind bisher gut verstanden. Die akute Phase der Allergie, die Effektorphase, und die Abheilung, Limitierung, sind hingegen weniger gut charakterisiert und derzeit im Fokus der Forschung.

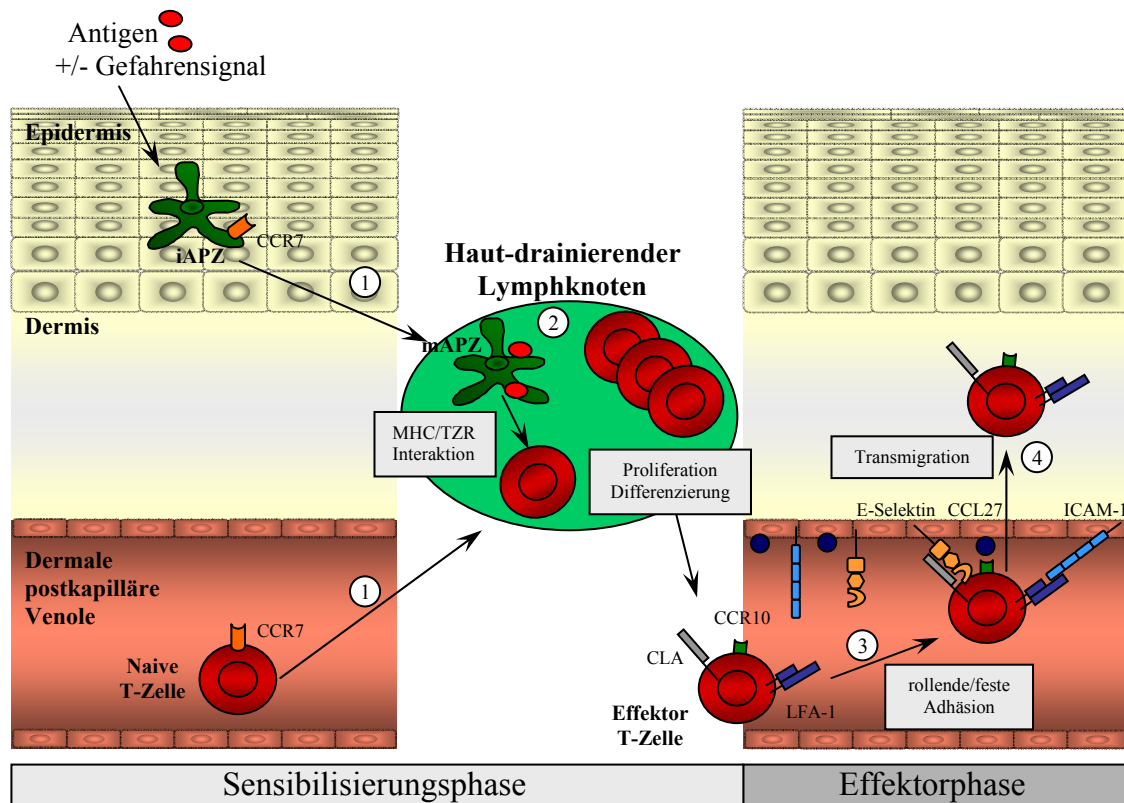
Zu den häufigsten allergischen Erkrankungen der Haut zählen die allergische Kontaktdermatitis und das Ekzem, das sich weiter unterteilt in eine atopische und eine nicht atopische Form. Ekzematöse Erkrankungen sind verbunden mit deutlichen Einschränkungen im alltäglichen Leben, die einhergehen mit ausgeprägtem Juckreiz, bewusstem Meiden von Allergie-auslösenden Situationen und dem Gefühl des Stigmas. Wissensbedarf besteht auch hier im Bereich der Effektorphase und der Limitierung dieser überschießenden Antwort des Immunsystems.

In dieser Arbeit sollen die Interaktionen der zwei Hauptspieler in der Ekzemreaktion – Keratinozyten und T-Zellen – näher charakterisiert werden, um erweiterte Einblicke in die Effektorphase und vor allem die Mechanismen der Limitierung zu erhalten.

## 1.1. Entstehung von Immunreaktionen in der Haut

Die Haut stellt beim Erwachsenen mit ca. 2m<sup>2</sup> das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie grenzt den Organismus einerseits vor schädlichen Einflüssen aus der Umwelt ab, ermöglicht ihm andererseits aber auch den Austausch mit seiner Umgebung. Antigene aus Bakterien, Pollen, Hausstaubmilben, Schmuck, etc. treffen jeden Tag in großer Anzahl auf die Haut und müssen vom Immunsystem als ungefährlich oder fremd und potentiell gefährlich eingestuft werden. Antigene können entweder aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (Haptene) oder über eine gestörte Hautbarriere in den Körper eindringen und dort mit residenten Zellen des Immunsystems interagieren. In der Epidermis ansässige Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die Langerhanszellen (LZ), oder die in der Dermis beheimateten dermalen Dendritischen Zellen, DZ, tragen als professionelle APZ die Aufgabe, Antigene aufzunehmen und sie zu prozessieren, um für dieses Antigen spezifische T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen. Diese T-Zellen wandern wiederum zurück in die Haut und beseitigen das in den Körper eingedrungene Antigen.

Beim ersten Kontakt mit einem sensibilisierenden Agens spricht man von der Sensibilisierungsphase, deren Prozesse für den Menschen symptomlos verlaufen. Hierbei werden APZ nach der Aufnahme des Antigens entweder durch das Antigen selbst, z.B. durch bakterielle Bestandteile oder durch proinflammatorische Wirkung des Antigens auf andere Zellen der Haut, z.B. Induktion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Keratinozyten [74], angeregt, sich aus dem Zellverband zu lösen und über die Lymphbahn in regionale Lymphknoten einzuwandern (Abb. 1). Während dieser Wanderung differenzieren APZ von immaturen zu maturen Zellen, die ihre Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme verlieren, dafür aber durch die Hochregulation der konstitutiv exprimierten MHC-Klasse I und -Klasse II Moleküle und kostimulatorischen Moleküle (u.a. CD80 und CD86) zur Stimulation naïver T-Zellen befähigt werden. Reife APZ exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 und sie bewegen sich entlang eines CCL21/CCL19 Chemokin Gradienten, der durch ein spezialisiertes Endothel (Venolen mit hohem Endothel, HEV) aufgebaut wird, in Richtung der Lymphknoten. Innerhalb des Lymphknotens wandern sie in die T-Zellzone und präsentieren das aufgenommene Antigen ebenfalls infiltrierenden naïven T-Zellen [62, 76].



**Abb. 1 : Entstehung von in die Haut migrierender T-Effektorzellen**

Naïve T-Zellen wandern über die Expression des CCR7 in Lymphknoten ein und treffen dort auf mature APZ, die Antigene in der Haut aufgenommen und prozessiert haben und es auf MHC-Molekülen an die T-Zellen präsentieren. Erkennen naïve T-Zellen das spezifische Antigen, proliferieren und differenzieren sie im Mikromilieu des Haut-drainierenden Lymphknoten zu CLA<sup>+</sup> Effektor T-Zellen, die zunächst zurück ins Blut und schließlich über die Erkennung von E-Selektin und vom Endothel präsentierten Chemokinen in ihr Zielorgan - die Haut - einwandern. (iAPZ/mAPZ: immature/mature APZ)

Naïve T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche L-Selektin (CD62L), das an sulfatisierte Sialyl Lewis<sup>x</sup> Seitengruppen der sog. vaskulären Adressine (CD34 oder GlyCam-1) auf HEV bindet und sie somit befähigt, in Lymphknoten einzuwandern (Abb. 1). Die Interaktion des L-Selektins mit vaskulären Adressinen vermittelt zusammen mit dem  $\beta$ 2-Integrin LFA-1, das an ICAM-1 und ICAM-2 Moleküle auf dem Endothel bindet, eine rollende Adhäsion an das Endothel. Erst wenn das Endothel zusätzlich Chemokine exprimiert und die T-Zelle diese über entsprechende Rezeptoren bindet, geht die rollende Adhäsion in eine feste Bindung über und die Transmigration der naïven T-Zelle in den Lymphknoten wird induziert. Bei diesen Schlüssel-Chemokinen handelt es sich, wie bei den infiltrierenden APZ, ebenfalls um CCL21

und CCL19, die an den CCR7 Rezeptor auf der naiven T-Zelle binden und sie zusätzlich im Lymphknoten in die T-Zellzone geleiten [91].

In der T-Zellzone des Lymphknotens treffen naive T-Zellen auf die eingewanderten APZ, die ihnen Peptide des ursprünglichen Antigens auf MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II Molekülen präsentieren.  $CD8^+$  naive T-Zellen suchen die APZ nach einem passenden antigenen Peptid ab, das über MHC-Klasse I Moleküle präsentiert wird und mit dem T-Zellrezeptor (TZR) nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip zusammen passt.  $CD4^+$  naive T-Zellen suchen nach Peptiden auf MHC-Klasse II Molekülen [166]. Diese enge Interaktion der beiden Zellen wird als sog. T-Zell-APZ Dialog bezeichnet und über verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1, ICAM-3, CD2 seitens der T-Zelle und ICAM-1, ICAM-2, DC-Sign, CD58 seitens der reifen APZ vermittelt [30]. Ist diese Suche nicht erfolgreich, verlassen naive T-Zellen den Lymphknoten über efferente Bahnen, gelangen zurück in die Blutbahn und beginnen die Suche erneut in einem anderen Lymphknoten. Bindet allerdings der TZR an ein MHC-Molekül mit dem richtigen Peptid, kommt es, ähnlich dem Übergang von rollender zu fester Adhäsion, zu einer Konformationsänderung des LFA-1 Integrins und somit zu einer engen Interaktion zwischen beiden Zellen, die schließlich in der klonalen Expansion der naiven T-Zelle resultiert [30]. Hierzu müssen jedoch zwei Signale von derselben APZ an die T-Zelle übermittelt werden [91]:

Signal 1: Bindung des MHC-Klasse Moleküls mit gebundenem Peptid an den TZR

nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip

Signal 2: Übermittlung eines kostimulatorischen Signals an die T-Zelle

Das Immunsystem hat unterschiedliche Möglichkeiten, um auf eingedrungene Fremdantigene zu reagieren; so werden extrazelluläre Bakterien eine Reaktion hervorrufen, die Makrophagen vermehrt dazu anregt, diese phagozytisch aufzunehmen und abzutöten ( $T_H1$  Antwort), wohingegen extrazelluläre Parasiten, die zu groß sind, um von Makrophagen aufgenommen zu werden, eine Reaktion induzieren, die die Bildung opsonisierender Antikörper und Effektormechanismen von Eosinophilen Granulozyten zur Folge hat ( $T_H2$  Antwort). Diese Weichenstellung der Immunreaktion wird ebenfalls im Lymphknoten von APZ durch ein drittes Signal übermittelt, das Zytokinsignal. Dieses Signal 3 bewirkt die Differenzierung der naiven T-Zelle zu einer Effektorzelle, die entweder inflammatorische oder regulatorische Eigenschaften besitzt (siehe 1.2) [14].

Effektor T-Zellen unterscheiden sich in ihrer Ausstattung an Oberflächenmolekülen deutlich von naiven T-Zellen; so verlieren sie die Expression des L-Selektins während der Differenzierung und können somit nicht mehr in Lymphknoten einwandern, zudem sind sie gekennzeichnet durch eine hohe Expression von LFA-1, CD2 und CD44 und durch eine alternative Splice Variante des CD45 Moleküls, CD45RO [91]. Neugebildete Effektorzellen verlassen den Lymphknoten über efferente Lymphbahnen, gelangen zurück ins Blut und finden über sog. „Homing“ Moleküle ihren Weg in das Zielorgan, in dem das Antigen ursprünglich von APZ aufgenommen wurde (Abb. 1).

90% der in die Haut wandernden T-Zellen exprimieren das „Homing“ Molekül „cutaneous lymphocyte antigen“, CLA, das ähnlich wie Sialy Lewis<sup>x</sup>, eine Kohlehydratstruktur ist, die ein Epitop des Oberflächenmoleküls PSGL-1 darstellt [137]. Das Mikromilieu des Haut drainierenden Lymphknotens scheint in Zusammenwirken mit IL-12 zur Induktion des CLA Moleküls in naiven T-Zellen zu führen [195]. Entscheidend ist hierfür die Aktivität der  $\alpha$ 1,3Fucosyltransferasen IV und VII, die die finale sialofucosylierung der Zuckerstruktur durchführen und deren Fehlen zu einer reduzierten bzw. nicht mehr induzierbaren Kontaktreaktion im Mausmodell führt [171]. Interessanterweise inhibiert die Anwesenheit von IL-4 im Lymphknoten die Expression von CLA, was wiederum die vorherrschende Dominanz von Typ1 Zellen in der Kontaktreaktion erklären könnte [195]. Das CLA Antigen ist beteiligt an den komplexen Interaktionen zwischen zirkulierenden T-Zellen und kutanem vaskulärem Endothel, die während der Wanderung der T-Zellen in die Haut stattfinden. Der Prozess der Leukozyten Extravasation in Lymphknoten [173] kann auch auf die Migration von CLA<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut übertragen werden: Unter inflammatorischen Bedingungen induzieren proinflammatorische Mediatoren, wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, ICAM-1, auf der Oberfläche von Endothelzellen. Selektine sind verantwortlich für die lose Bindung der T-Zellen an das Endothel und die rollende Adhäsion, die es ihnen ermöglicht, die Endotheloberfläche nach weiteren Molekülen, wie Chemokinen und Molekülen der Immunglobulin Superfamilie, z.B. ICAM-1, abzusuchen. Interaktionen zwischen CLA/E-Selektin, VLA-4/VCAM-1 und LFA-1/ICAM-1 sind unumgänglich für die transendotheliale Migration der T-Zellen [146, 154, 155], aber reichen alleine nicht aus. Chemokine sind in diesen Prozess kritisch involviert; sie werden ebenfalls von aktiviertem Endothel auf der Oberfläche präsentiert und induzieren nach Bindung an ihre Rezeptoren auf der T-Zelle eine Konformationsänderung des Integrins LFA-

1, überführen somit die rollende Adhäsion in eine feste Bindung an das Endothel und sind auch in die Änderung der Zellmorphologie während der Diapedese involviert [103].

Eine Vielfalt von Chemokinrezeptoren konnte auf CLA<sup>+</sup> Effektorzellen identifiziert werden; unter diesen CXCR2 [153], CCR4 [35], CCR6 [84], CXCR3 [149] und CCR10 [85] (siehe auch Tabelle im Anhang). Von diesen Rezeptoren kommt CCR10 eine besondere Bedeutung zu, da er CCL27 (CTACK) bindet, das ausschließlich von basalen Keratinozyten gebildet und durch eine Entzündungsreaktion verstärkt exprimiert wird [83]. Zudem ist die Expression von CCR10 auf die CLA<sup>+</sup> T-Zell Population beschränkt [87]. Somit ist die Wechselwirkung von CCR10/CCL27 und CLA/E-Selektin in der Lage, gezielt T-Effektorzellen in die Haut zu dirigieren. Die Effektorfunktionen der in die Haut infiltrierenden T-Zellen werden im Einzelnen bei den Krankheitsbildern der allergischen Kontaktdermatitis und des atopischen Ekzems diskutiert.

## 1.2 T-Zell Subpopulationen

In den 80er Jahren untersuchten Mosmann und Coffman [39, 113] das Vorhandensein unterschiedlicher Subpopulationen in der CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion. So wurde die T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Hypothese formuliert, die trotz mancher Unschlüssigkeit bis heute Bestand hat:

T<sub>H</sub>1 T-Zellen übernehmen im Immunsystem üblicherweise die Aufgabe der Virusabwehr und der Abwehr von intrazellulären Bakterien, indem sie Phagozyten zur Abtötung der aufgenommenen Pathogene aktivieren und die Bildung opsonisierender, Komplement-aktivierender IgG Antikörper anregen. Das Effektorzytokin der T<sub>H</sub>1 Zellen ist IFN- $\gamma$  und sie sind zudem durch die Expression der Zytokinrezeptoren für IL-12 und IL-18 und der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 gekennzeichnet. Naïve T-Zellen differenzieren in der Gegenwart von IL-12 zu T<sub>H</sub>1 Zellen, das an den IL-12 Rezeptor der naïven Zelle bindet, und über den Transkriptionsfaktor STAT-4 die Expression T<sub>H</sub>1-spezifischer Gene, u.a. des Gens für IFN- $\gamma$ , induziert. Einen spezifischen Marker für die T<sub>H</sub>1 Population stellt der Transkriptionsfaktor T-bet dar, der durch IFN- $\gamma$  induziert wird und eine Amplifikation der T<sub>H</sub>1 Entwicklung bewirkt (Abb. 2) [14, 39, 113].

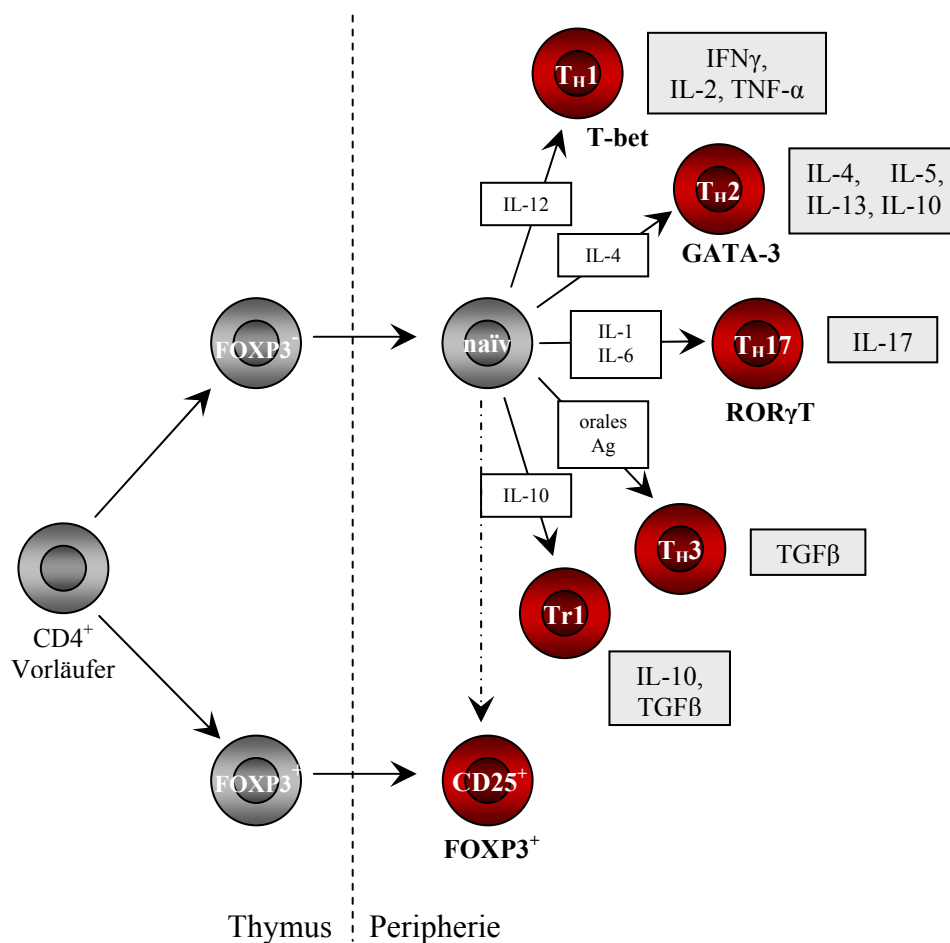
T<sub>H</sub>2 Zellen tragen die Aufgabe der Abwehr von extrazellulären Parasiten, die mit der Produktion von IgE Antikörpern einhergeht. Da die Infektion mit diesen Parasiten in der westlichen Welt durch verbesserte Hygienestandards immer mehr in den Hintergrund getreten ist, kommt der Beteiligung von T<sub>H</sub>2 Zellen an allergischen Reaktionen immer größeres Interesse zu. Die Effektorzytokine von T<sub>H</sub>2 Zellen sind u.a. IL-4 und IL-5, die den Isotypwandel in B-Zellen zu IgE Antikörpern bewirken und die Differenzierung und das Überleben von Eosinophilen fördern. Zusätzlich können T<sub>H</sub>2 Zellen durch die fehlende Expression der Rezeptoren für IL-12 und IL-18 und die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 charakterisiert werden. In der Anwesenheit von IL-4 differenzieren naive T-Zellen über die Aktivierung von STAT-6 zu T<sub>H</sub>2 Zellen. Für die Expression der Zytokingene ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-3 verantwortlich. Das neugebildete IL-4 wirkt parakrin über weitere Stimulation von STAT-6 amplifizierend auf eine sich entwickelnde T<sub>H</sub>2 Antwort (Abb. 2) [14, 39, 113].

T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen beeinflussen zudem wechselseitig die Bildung von Effektorzellen des anderen Typs. So konnte gezeigt werden, dass T<sub>H</sub>1 Zellen durch die Produktion von IFN- $\gamma$  die Entwicklung von T<sub>H</sub>2 unterbinden und umgekehrt T<sub>H</sub>2 Zellen durch IL-4 die T<sub>H</sub>1 Entwicklung hemmen können [14, 39, 113].

Eine Überarbeitung der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Hypothese erfolgte 2003, als Cua et al. IL-23 als außerordentlich wichtigen Faktor in der Entstehung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) im Mausmodell identifizieren konnten [46]. IL-23 bewirkt die Bildung einer T-Zellsubpopulation, die durch die Sekretion von IL-17, IL-6 und TNF gekennzeichnet ist und heute als T<sub>H</sub>17 Zellen bezeichnet wird (Abb. 2). Im Mausmodell konnte TGF- $\beta$  in Zusammenwirken mit IL-6 als weiterer Faktor, der die Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>17 Zellen anregt, identifiziert werden. TGF- $\beta$  alleine induziert hingegen T-Zellen mit regulatorischer Funktion [24]. In einer kürzlich erschienen Arbeit von Acosta-Rodriguez et al. konnte gezeigt werden, dass im humanen System nicht TGF- $\beta$  sondern IL-1 im Zusammenspiel mit IL-6 die Bildung von T<sub>H</sub>17 Zellen bewirkt [1]. Neben der Produktion von IL-17 können T<sub>H</sub>17 Zellen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T charakterisiert werden [89]. Bei einer Reihe von Krankheitsbildern unterschiedlicher Organsysteme, wie dem Gehirn (z.B. bei Multipler Sklerose), Gelenken (rheumatoide Arthritis), Herz (Myokarditis) und der Lunge (bronchiale Hyperreagibilität) konnte in experimentellen Modellen eine Beteiligung von T<sub>H</sub>17 Zellen nachgewiesen werden [174].

Albanesi et al. konnten zeigen, dass auch Nickel-spezifische T-Zellen in der Lage sind IL-17 zu sezernieren; eine Rolle dieser Zellen bei der allergischen Kontaktdermatitis liegt somit nahe [7].

Auch  $T_H17$  Zellen werden durch die Aktionen anderer T-Zellpopulationen beeinflusst, so wurde ein über  $IFN-\gamma$  vermittelter hemmender Effekt von  $T_H1$  auf  $T_H17$  Zellen beschrieben, der in der EAE eine Aggravation und weiteren Gewebeschaden verhindern kann.  $T_H1$  Zellen stellen somit eine anti-inflammatorische Bremse für den durch  $T_H17$  induzierten Gewebeschaden dar.  $T_H2$  Zellen inhibieren über IL-4 die Produktion von IL-17, wohingegen TNF und IL-23 die IL-17 Expression verstärken [102, 133].



**Abb. 2:  $CD4^+$  T-Effektorzellen**

$CD4^+$  T-Zellen entwickeln sich im Thymus und differenzieren in der Peripherie aus einer  $CD4^+$   $FOXP3^-$  Vorläuferzelle in  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  Effektorzellen oder in regulatorische  $T_H3$  und  $Tr1$  Zellen. Die Vorläuferzelle der  $FOXP3^+$  regulatorischen T-Zellen ist bisher noch nicht vollständig charakterisiert.



Eine der wichtigen Fähigkeiten des Immunsystems ist es, zwischen Selbst und Nicht-Selbst unterscheiden zu können, um einerseits die immunologische Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen aufrecht zu erhalten und andererseits schützende Immunantworten gegen Fremd-Antigene zu induzieren. Die Eliminierung von unreifen, selbst-reaktiven T-Zellen erfolgt bereits bei ihrer Entstehung im Thymus über den Mechanismus der negativen Selektion und ist bei der Ausbildung der Selbst-Toleranz entscheidend; in den letzten Jahrzehnten verdichteten sich Hinweise auf T-Zell Subpopulationen, die in der Peripherie in der Lage sind selbst-reaktive T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entgangen sind, unschädlich zu machen. Diese T-Zellen werden als regulatorische T-Zellen bezeichnet. Bisher sind sieben T-Zell Subpopulationen mit regulatorischer Aktivität beschrieben, von denen die natürlich auftretenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Treg) und die induzierbaren Tr1 Zellen die am besten charakterisierten Populationen darstellen.

Natürlich auftretende Treg entwickeln sich im Thymus und sind durch die hohe Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, CD25, auf ihrer Zelloberfläche und die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 („forkhead box P3“) und des zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens, CTLA-4 von konventionellen Effektorzellen abgrenzbar [57, 178]. Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen nehmen sie einen Anteil von 1-10% ein. Ursprünglich wurden sie als anerge Zellen beschrieben, die spezifisch über den T-Zellrezeptor mit dem Selbst-Antigen aktiviert werden, jedoch unspezifisch die IL-2 vermittelte Proliferation der Zielzellen über Zell-Zell Kontakt verhindern. In neueren Arbeiten wurde jedoch auch eine regulatorische Wirkung dieser Zellen durch sezerniertes TGF- $\beta$  und/oder IL-10 beschrieben [13, 68]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen regulieren T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Antworten und Immunantworten auf Pathogene und Allergene [20, 21, 109].

Tr1 Zellen wurden erstmals in der Maus von Groux et al. beschrieben, der durch repetitive Stimulation mit Ovalbumin in der Anwesenheit von IL-10 eine T-Zellpopulation induzieren konnte, die sich durch ihre hohe IL-10 und mäßige TGF- $\beta$  Produktion auszeichnete [72, 105]. Bisher ist unbekannt, aus welchen Vorläuferzellen Tr1 Zellen *in vivo* hervorgehen. In der Literatur sind sowohl Tr1 Zellen beschrieben, die nur IL-10 produzieren, als auch Zellen, die zusätzlich IFN- $\gamma$ , IL-5 oder TGF- $\beta$  jedoch kein IL-2 und IL-4 bilden, was sowohl naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen, als auch T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 Zellen als Vorläufer möglich erscheinen lässt [72].

IL-10 produzierende Tr1 Zellen hemmen die Proliferation ihrer Zielzellen in Allergen-spezifischer Weise über die Produktion von IL-10 [6, 148].

Studien von drei unabhängigen Gruppen zeigten einen deutlichen Einfluss einer beeinträchtigten Inhibition von Allergen-spezifischen T<sub>H</sub>2 Zellen durch natürlich auftretende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg bei allergischen Patienten während der Pollenflugsaison [71, 109] und bei Patienten, die mit einer T<sub>H</sub>2 Antworten auf Allergen reagieren [21]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen in Vollblut von gesunden Spendern zu einer vermehrten Proliferation und Zytokinproduktion von T<sub>H</sub>2 Zellen auf Allergene aus Milch und Gräsern führt [109, 176]. Gesunde Probanden weisen im Vergleich zu Allergikern und Asthmatikern eine erhöhte Frequenz von IL-10 produzierenden Tr1 Zellen auf [6]. Interessanterweise erhöht sich die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und der IL-10 produzierenden T-Zellen bei Patienten, die auf natürliche Weise eine Toleranz entwickeln, wie bei der Milch Allergie oder bei Bienenzüchtern [3, 97].

Humane Nickel-spezifische Tr1 Zellen wurden erstmals von Cavani et al. [37], und von Sebastiani et al. als Zellen mit Expression von T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 assoziierten Chemokinrezeptoren (CXCR3, CCR5 bzw. CCR3, CCR4, CCR8) näher charakterisiert [165].

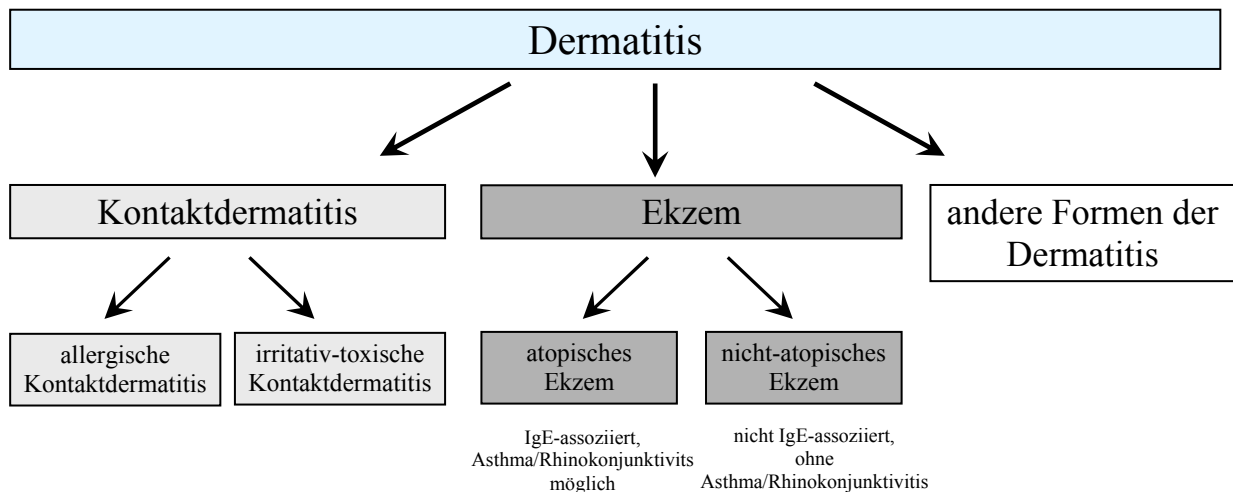
Somit scheinen natürlich auftretende Treg und IL-10 produzierende Tr1 Zellen aktiv an der Suppression von allergischen Reaktionen auf Umweltantigene in gesunden Individuen beteiligt zu sein; möglicherweise wird deren Funktion durch chronische Allergen-Exposition bei Allergikern beeinträchtigt [147].

## **1.3 Das Ekzem**

### **1.3.1 Nomenklatur ekzematöser Hauterkrankungen**

Die Häufigkeit ekzematöser Erkrankungen und deren intensives Studium haben im letzten Jahrhundert zu einer Fülle verschiedener Namen für dieses Krankheitsbild geführt, die schließlich im Jahre 2004 die World Allergy Organization (WAO) dazu veranlassten, eine einheitliche Nomenklatur zu schaffen (Abb. 3) [92]. So werden unter dem Oberbegriff Dermatitis die Kontaktdermatitis, das Ekzem und andere Formen der Dermatitis, wie z.B. das seborrhoische Ekzem zusammengefasst. Bei der Kontaktdermatitis unterscheidet man die

allergische Form, die durch eine Sensibilisierungsphase mit anschließender Effektorphase und immer gleicher Reaktion nach weiterem Allergen-Kontakt gekennzeichnet ist, von der irritativ-toxischen Form, die sofort nach Noxen-Kontakt zur Reaktion führt und keiner Sensibilisierung bedarf. Der Begriff Ekzem kommt entzündlichen Hauterkrankungen mit bestimmten Charakteristika zu: so bezeichnet man als atopisches Ekzem Reaktionen, denen eine Sensibilisierung des Patienten zu Grunde liegt und die gekennzeichnet ist durch einen spezifischen Serum IgE Titer  $>150$  kU/l und allergischer Rhinokonjunktivitis oder allergischer Reaktion auf Nahrungsmittel oder Pollen oder Asthma. Als nicht-atopisches Ekzem werden Reaktionen bezeichnet, bei denen keine Sensibilisierung (Gesamt IgE  $<150$  kU/l) vorliegt und keine der oben beschriebenen allergischen Reaktionen auftreten. Etwa 80% der an Ekzem erkrankten Erwachsenen leiden an einem atopischen Ekzem, wohingegen 10-20% von einem nicht-atopischen Ekzem betroffen sind.



**Abb. 3 : Nomenklatur ekzematöser Hauterkrankungen (nach [92])**

Im Weiteren werden die Mechanismen und Fehregulationen im Immunsystem erläutert, die zur Ausprägung einer allergischen Kontaktreaktion auf Haptene oder zur Entstehung von atopischen Ekzempläsionen führen.

### 1.3.2 Die allergische Kontaktdermatitis

Durch Kontaktallergien verursachte Hautkrankheiten sind in der Regel nicht lebensbedrohlich, stellen jedoch für den Betroffenen eine einschneidende Diagnose mit zum Teil erheblichen Konsequenzen dar. Beruflich und außerberuflich erworbene Kontaktallergien sind ein volkswirtschaftlich nicht zu unterschätzender Kostenfaktor, der Berufsgenossenschaften jährlich ca. 125 Millionen Euro kostet [23]. Im Formenkreis der Kontaktdermatitis wird die allergische Form von der irritativ-toxischen Form unterschieden (Abb. 3). Der Erstkontakt mit einem Kontaktallergen führt bei der allergischen Kontaktdermatitis im Gegensatz zur irritativ-toxischen Kontaktreaktion zu keiner Reaktion. Erst wenn eine Sensibilisierung gegenüber dem Allergen stattgefunden hat, kommt es bei jedem erneuten Kontakt zu ekzematösen Läsionen die zeitverzögert nach ca. 48-72 Stunden auftreten und aufgrund dieser verzögerten Kinetik als Spättyp- oder Typ-IV Reaktionen [42] bezeichnet werden. Die allergische Kontaktdermatitis zeigt eine Prävalenz von 15,9% bis 28% [48, 158]. Die häufigsten Kontaktallergene sind Nickel (15,5%), Duftstoff-Mix (11,7%) und p-Phenylendiamin (4,6%). In einer Studie wurde die Häufigkeit der Sensibilisierung gegenüber diesen Agentien auf die Gesamtbevölkerung Deutschlands bezogen, die für Nickel im „medium“-Szenario bei 2,3% und im „worst case“-Szenario bei 5,5% liegt [162]. Frühe Beschreibungen der Nickelallergie datieren in die Jahre 1894 (ekzematöse Reaktionen auf das Durchstechen des Ohrläppchens) [180] und 1954 (Oberschenkelektzeme auf das Tragen von nickelhaltigen Strumpfhaltern) [34]. Eine Sensibilisierung auf Nickel liegt bei Frauen, die jünger als 40 Jahre sind, um ein fünffaches höher als bei Männern [79]; als Gründe hierfür werden das Tragen von nickelhaltigem Modeschmuck [187] oder das Auftragen von nickelhaltigem Lidschatten [152] oder eben das Tragen von Strumpfhaltern, wenn diese auch heutzutage etwas aus der Mode gekommen sind, diskutiert.

Durch die eingeführte „Nickel-Verordnung“, die eine maximale Freisetzung von Nickel bei Gegenständen, die längere Zeit in Kontakt mit der Haut kommen, von  $0,5\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{Woche}$  festsetzt [64], zeigt sich ein deutlich rückläufiger Trend mit Sensibilisierungsquoten bei Frauen von 1992: 36,7% und 2001: 25,8% und bei Männern von 1992: 8,9% und 2001: 5,2% des untersuchten Probandenkollektives [161]. Die Sensibilisierungsrate auf Nickel liegt heute jedoch im Durchschnitt bei immer noch 20% (Frauen). Vor diesem Hintergrund ist die Verwendung von Nickellegierungen im Euro aus allergologischer Sicht unverständlich [121].

Patienten mit einer Kontaktallergie zeigen häufig eine Polysensibilisierung auf mehrere Kontaktallergene, was als klinisches Zeichen für eine erhöhte Suszeptibilität an Kontaktreaktion zu erkranken gewertet wird und eine genetische Prädisposition wahrscheinlich macht. Die Ergebnisse aus Familien- und Zwillingsstudien sprechen ebenfalls für einen genetischen Einfluss bei der Ausbildung einer Kontaktallergie [111]. Untersuchungen an Patienten mit einer Kontaktallergie auf para-substituierte Alkylkomponenten, wie p-Phenylendiamin, zeigten ein vermehrtes Auftreten von Polymorphismen in den Promotorregionen des IL-16 und des TNF- $\alpha$  Gens im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe [144, 200], zusammen mit dem erhöhten Azetylierungsstatus dieser Patienten [199] ergibt sich ein Szenario, das zur schnellen Aktivierung von Immunmechanismen in der Haut führen könnte. Allerdings sind bisher keine Studien bekannt, die speziell genetische Polymorphismen in der Gruppe der Nickel-sensibilisierten Patienten zeigen. Assoziationen der allergischen Kontaktdermatitis mit bestimmten HLA Molekülen hingegen lieferten bisher kein konsistentes Bild und scheinen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [53, 88, 117, 167]. Dagegen konnte eine bevorzugte Nutzung des V $\beta$ 17 Elementes im  $\alpha/\beta$ -TZR von Nickel-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden. Die Komplementaritäts-determinierende Region 1 (CDR1) des V $\beta$ 17 Moleküls enthält Aminosäuresequenzen, deren Funktion die Bindung von Nickelionen ist und die somit eine Superantigen-ähnliche Verknüpfung zwischen dem TZR und MHC-Molekül bewirken könnten. Zudem scheint die Überrepräsentation des V $\beta$ 17 Elementes im Nickel-spezifischen Klonpool mit der Schwere der Kontaktreaktion zu korrelieren [194].

#### 1.3.2.1 Rolle von APZ in der allergischen Kontaktdermatitis

Nickelhaltiger Modeschmuck, Jeansknöpfe oder Euromünzen treffen auf die Haut und setzen in Kontakt mit Schweiß Nickel frei [121], Nickel penetriert durch die Haut, bindet dort vermutlich an Carrierproteine wie Humanes Serum Albumin und wird schließlich von APZ in der Haut aufgenommen. Nickel selbst hat eine proinflammatorische Wirkung auf APZ; so konnte in einer Arbeit von De Smedt et al. gezeigt werden, dass Nickel die Expression der kostimulierenden Moleküle CD83 und CD86, sowie HLA-DR, IL-6 und IL-12 in DZ stimuliert und somit die Reifung der immaturen zur maturaen DZ und deren Migration in die regionalen Lymphknoten bewirkt [47]. Im Lymphknoten wird das von DZ aufgenommene, an Carrierproteine gebundene Nickelmolekül naiven T-Zellen präsentiert, die daraufhin

proliferieren und unter Einfluss von IL-12 hauptsächlich zu Nickel-spezifischen  $T_H1$ -Effektorzellen differenzieren.

Haptene sind niedermolekulare Substanzen, die für sich nicht immunogen sind, sondern erst durch Bindung an Proteine und deren Veränderung in der Lage sind Immunreaktionen hervor zu rufen. Nickel wird als Hapten bezeichnet, kann aber T-Zellen auf vielfältigere Weise zur Proliferation anregen:

- Nickel bindet an Selbst-Proteine innerhalb der Zelle und verändert deren Struktur derart, dass sie als kryptische Selbstpeptide durch T-Zellen in MHC-abhängiger Weise als körperfremd erkannt werden [70].
- Prozessierungs-unabhängige Erkennung: extrazelluläre Bindung von Nickel an Peptide, die bereits von MHC-Molekülen präsentiert werden und Veränderung ihrer Struktur, die zur Immunogenität führt [116]
- Stimulation von T-Zellen durch Nickel in Super-Antigen ähnlicher Weise durch unspezifische Verknüpfung des MHC-Moleküls und des TZR [59]
- MHC- und CD1-unabhängige Erkennung, die zur Perforin-vermittelten Abtötung von Nickel-präsentierenden Zielzellen durch  $CD8^+$  T-Zellen führt [115]

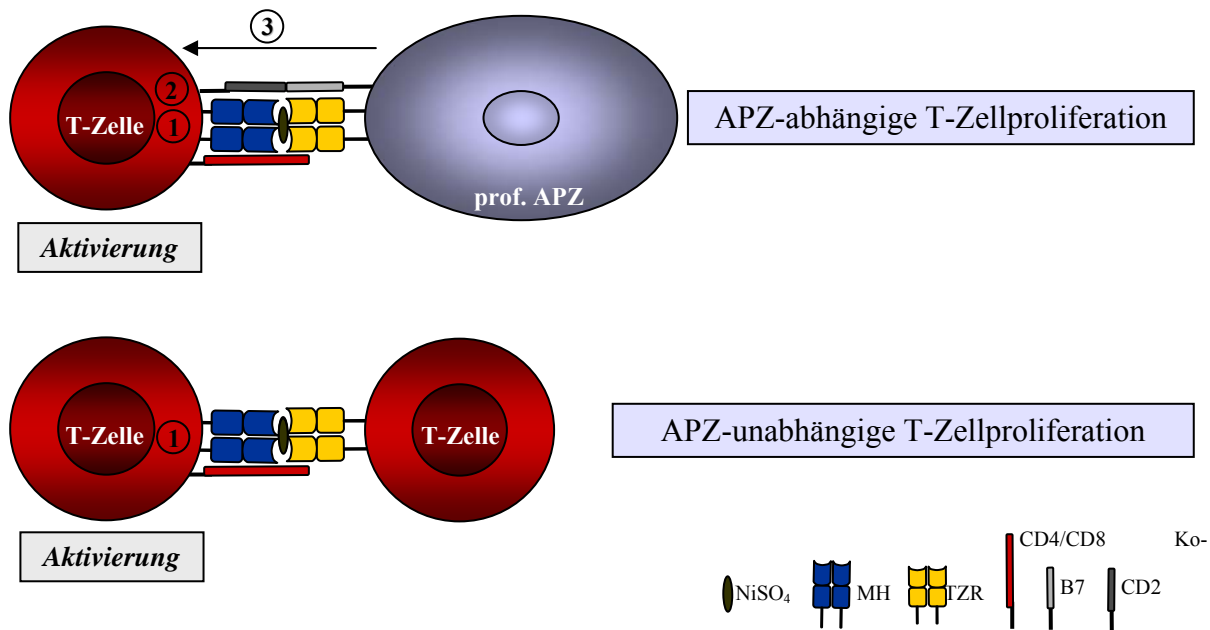
Die Präsentation von Nickel als Antigen nimmt eine Sonderstellung ein, da es zum Einen als Hapten an körpereigene Proteine binden muss, um zum Vollantigen zu werden, das über MHC-Klasse-II Moleküle von professionellen APZ präsentiert wird und zum Anderen auch ohne Beteiligung von APZ T-Zellen zur Proliferation anregen kann [120] (Abb. 4). Nickel-spezifische T-Zellen, die ohne APZ auf Nickel proliferieren, werden als „Selfpresenter“ bezeichnet, da sie sich in einer MHC-Klasse-II abhängigen Weise das Antigen selbst präsentieren dazu aber keinen bisher identifizierten Ko-Stimulus benötigen.

### 1.3.2.2 Rolle von T-Zellen in der allergischen Kontaktdermatitis

An der Ausprägung der allergischen Kontaktdermatitis sind sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellen beteiligt (Abb. 5). Beiden Subpopulationen kommen unterschiedliche Bedeutungen für die Pathogenese der Erkrankung zu.

Lange Zeit wurde die allergische Kontaktdermatitis als eine  $T_H1$ -vermittelte Immunreaktion bezeichnet; in den letzten Jahren jedoch konnte gezeigt werden, dass die murine Kontaktreaktion auf das Kontaktallergen 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) in IL-4 defizienten

Mäusen sowohl in der Ausprägung als auch der Dauer abgeschwächt ist [182]. Dies zeigt einerseits eine proinflammatorische Rolle von IL-4 und andererseits die Beteiligung von  $T_H2$  Zellen in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis auf. Mäuse in denen  $CD8^+$  T-Zellen depletiert wurden oder die eine MHC-Klasse I Defizienz aufweisen zeigten ebenfalls verringerte Kontaktreaktionen [28, 196]. Auch im Menschen zeigte sich eine deutliche Beteiligung von zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen, die über Perforin und Granzym B und/oder Fas/FasL Interaktionen Apoptose in Keratinozyten induzieren [183]. Dieser Mechanismus wird heute für die Gewebeschädigung bei Kontaktreaktionen verantwortlich gemacht.



**Abb. 4: APZ- unabhängige Allergen-spezifische T-Zellproliferation**

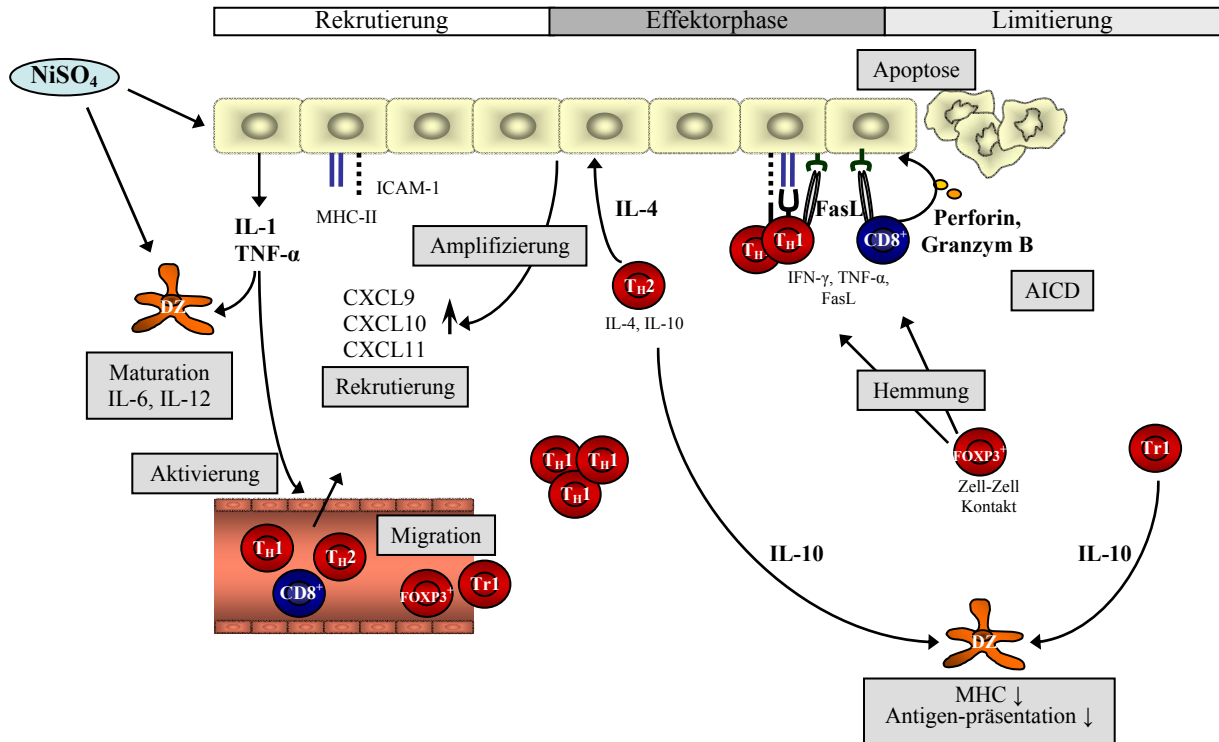
T-Zellen proliferieren auf Antigene, die von einer professionellen APZ in MHC-abhängiger Art und Weise präsentiert werden (obere Abbildung). Hierzu ist neben der spezifischen Antigenerkennung über den T-Zellrezeptor und das MHC-Molekül (1) noch ein weiteres Signal über Ko-stimulierende Moleküle (2) notwendig. Ein drittes Signal (3) induziert die Differenzierung der T-Zelle. Nickel-spezifische T-Zellen können selbst als APZ fungieren und sich Nickel in MHC-abhängiger, Ko-stimulus-unabhängiger Weise selbst präsentieren (untere Abbildung).

Auch der Einfluss unterschiedlicher  $CD4^+$  T-Zellpopulationen wurde näher analysiert. Während die Reaktion von Nickel-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen auf sensibilisierte Individuen beschränkt ist und mit der Schwere der Erkrankung korreliert, konnte gezeigt werden, dass

CD4<sup>+</sup> Nickel-spezifische T-Zellen bei sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Probanden in gleicher Zahl vorhanden waren. Interessanterweise fand sich eine höhere IL-10 Produktion in der Gruppe der nicht-sensibilisierten Probanden, was für eine regulatorische Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Kontaktreaktion spricht [36]. CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub> Zellen werden nach Initiierung der Reaktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen von den Chemokinen CXCL9, CXCL10 und CCL5 in die Haut rekrutiert (Anhang, Tabelle 1). Dort induzieren sie in IFN- $\gamma$  stimulierten Keratinozyten über Fas/FasL-Wechselwirkungen und über Perforin/GranzymB Apoptose und leisten so ebenfalls einen Beitrag zur Gewebeschädigung [183]. CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub> Zellen werden ebenfalls in der frühen Phase der Reaktion durch die Wirkung von CCL17 und CCL18 rekrutiert. T<sub>H2</sub> Zellen sind nicht in der Lage in Keratinozyten Apoptose zu induzieren; über ihr Effektorzytokin IL-4 können sie jedoch in Synergie mit dem von T<sub>H1</sub>-Zellen sezernierten IFN- $\gamma$ , Keratinozyten zur Produktion von CXCL9 und CXCL11 anregen, was zu einer amplifizierenden Rekrutierung von T<sub>H1</sub> Zellen führt [65, 183].

Die allergische Kontaktdermatitis auf Nickel ist eine selbst-limitierende Reaktion, an deren Heilung vermutlich regulatorische T-Zellen beteiligt sind. Cavani et al. konnten zeigen, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-reg im Blut von gesunden Probanden sowohl die Aktivität von Nickel-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektorzellen als auch die Proliferation naiver T-Zellen mittels Zell-Zell Kontakt unterbinden können. Bei sensibilisierten Individuen scheint dieser Regulationsmechanismus allerdings gestört zu sein [37]. Sebastiani et al. beschrieben eine weitere Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Aktivität, die sich durch hohe IL-10 gepaart mit geringer IFN- $\gamma$  Produktion und keiner IL-4 Sekretion auszeichnet. Diese Tr1 Zellen stellen mit 7-10% der Nickel-spezifischen T-Zellen eine relativ große Unterpopulation dar und tragen auf ihrer Oberfläche Chemokinrezeptoren, die sowohl für die Rekrutierung von T<sub>H1</sub> als auch T<sub>H2</sub> Zellen beschrieben wurden. Nach Aktivierung durch Nickel verringert sich die Expression der meisten der Chemokinrezeptoren, doch eine Migration auf CCL1, CCL2 und CCL17 bleibt erhalten. Interessant ist hierbei die Wanderung von Tr1 Zellen auf CCL1, das in entzündeter Haut überexprimiert wird [165].





**Abb. 5: Immunmechanismus der allergischen Kontaktdermatitis**

Das Kontaktallergen Nickel ist durch die Induktion von  $\text{IL-1}$  und  $\text{TNF-}\alpha$  in Keratinozyten maßgeblich an der Induktion der Kontaktreaktion beteiligt. Nickel-spezifische Effektor T-Zellen migrieren entlang eines Chemokingradienten aus dem Blut in die Haut und interagieren dort mit Keratinozyten. Diese Interaktion endet im Falle von  $\text{T}_{\text{H}1}$  und  $\text{CD8}^+$  Zellen in der Apoptose des Keratinozyten und der Auflösung des Zellverbandes.  $\text{T}_{\text{H}2}$  Zellen amplifizieren einerseits durch von ihnen sezerniertes  $\text{IL-4}$  die Migration von  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zellen sind aber andererseits zusammen mit regulatorischen T-Zellen an der Limitierung der Reaktion beteiligt. (AICD: activation induced cell death)

Während der Effektorphase des allergischen Kontaktekzems sind somit vielfältige T-Zellsubpopulationen beteiligt, die einerseits einen Beitrag zur Gewebeschädigung und zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen leisten ( $\text{CD8}^+$  zytotoxische T-Zellen und  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zellen) und andererseits aktiv an der Selbstheilung der Läsion beteiligt sind (Treg und  $\text{Tr1}$ ).

### 1.3.3 Das atopische Ekzem

Das atopische Ekzem ist gekennzeichnet durch chronisch-rezidivierende, ekzematöse, stark juckende Hautveränderungen, die einhergehen mit einer trockenen Haut (Xerosis) und einer vergrößerten Hautstruktur (Lichenifikation). Eine klinische Unterscheidung zwischen atopischem und nicht-atopischem Ekzem ist nicht möglich. Zur Diagnose werden die sog. Atopie-Stigmata herangezogen, zu denen die tiefe Furchung der Handlinien (Ichtyosis Hand), die Ausdünnung der seitlichen Augenbrauen (Herthoge Zeichen), die doppelte Unterlidfalte (Dennie-Morgan-Zeichen), die ausgeprägte Xerosis und Lichenifikation und die weißliche Verfärbung der Haut nach Reiben (weißer Dermographismus) zählen [12].

Histologisch gesehen kann ein atopisches Ekzem kaum von einer Kontaktdermatitis unterschieden werden. In beiden Reaktionen zeigen sich eine Spongiose und die Infiltration von T-Zellen in die Dermis und Epidermis. Chronische Ekzempläsionen sind zudem gekennzeichnet durch eine Akanthose, Hyper- und Parakeratose, sowie durch endotheliale Hyperplasie und Fibrose. Interessanterweise und im Gegensatz zur Kontaktläsion, finden sich in auch klinisch gesunder Haut von Patienten mit atopischen Ekzem bereits erhöhte Lymphozytenzahlen [124].

Die Inzidenz des atopischen Ekzems hat wie die allergischer Erkrankungen im Allgemeinen in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen; so sind ca. 15-30% der Kinder und 2-10% der Erwachsenen in den westlichen Industrieländern betroffen. Eine eindeutige Ursache für diesen Anstieg zu finden ist allerdings schwer auszumachen, da es sich beim atopischen Ekzem um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, die einerseits bis zu einem gewissen Grad genetisch bedingt ist, aber auch durch Einflussfaktoren aus der Umwelt, wie z.B. Allergenen und Mikroorganismen zusätzlich getriggert werden kann. Im Weiteren sollen Faktoren, die prädisponierend auf die Entwicklung eines atopischen Ekzems wirken und der Immunmechanismus dargestellt werden.

#### 1.3.3.1 Vorherrschende T<sub>H</sub>2 Immunitätslage bei Patienten

Patienten mit atopischen Ekzem zeigen eine T<sub>H</sub>2 dominierte Immunitätslage, die gekennzeichnet ist durch eine periphere Eosinophilie und einen erhöhten Gesamt Serum IgE Spiegel. Zudem sind die Serumspiegel des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN- $\gamma$  erniedrigt und die Frequenz von IL-4, IL-5 und IL-13 produzierenden Allergen-spezifischen Zellen im Blut ggü. gesunden

Kontrollen deutlich erhöht [188]. Akdis et al. beschrieben zudem eine  $T_H2$  Dominanz, die auf den vermehrten programmierten Zelltod von  $T_H1$  Zellen im Blut bei Patienten mit atopischem Ekzem zurück zu führen war [5]. In Zusammenwirken dieser Mechanismen ergibt sich eine Ausgangssituation des Immunsystems, die das Überleben von Eosinophilen (IL-5) und den Isotyp Switch zur IgE Produktion (IL-4, IL-13) unterstützt.

TSLP („thymic stromal lymphopoetin“) ist ein weiterer Faktor, der für die vorherrschende  $T_H2$  Dominanz verantwortlich sein könnte. TSLP wird von humanen Keratinozyten, bronchialen Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Lungenfibroblasten und aktivierten Mastzellen sezerniert und kann die vermehrte Differenzierung naiver T-Zellen zu  $T_H2$  Zellen bewirken. TSLP bewirkt eine Aktivierung von humanen DZ (Hochregulation von MHC-Klasse II Molekülen, CD80, CD86) induziert jedoch nicht die Sekretion des  $T_H1$ -polarisierenden Zytokins IL-12 [172]. Liu et al. berichten, dass TSLP zudem die Sekretion der Chemokine CCL17 und CCL22 anregt und so ein  $T_H2$  freundliches Mikromileu schaffen kann [110]. Soumelis et al. konnten zeigen, dass TSLP stimulierte DZ *in vitro* die Differenzierung naiver T-Zellen zu sog. inflammatorischen  $T_H2$  Zellen induzieren. Diese unterscheiden sich von ‚normalen‘  $T_H2$  Zellen durch ihre vermehrte TNF und verringerte IL-10 Produktion [172]. Die Expression von TSLP ist in akuten und chronischen atopischen Ekzempläsionen deutlich erhöht und kann in gesunder Haut und der allergischen Kontaktreaktion auf Nickel nicht nachgewiesen werden [172]. Möglicherweise haben TSLP-stimulierte DZ über die Induktion inflammatorischer  $T_H2$  Zellen und die vermehrte Sekretion von  $T_H2$  Chemokinen einen Anteil an der initialen  $T_H2$ -Dominanz der atopischen Ekzemreaktion .

### 1.3.3.2 Chemokine in der Pathogenese des atopischen Ekzems

Chemokine sind die Basis des interzellulären Kommunikationssystems, das entscheidend zur Rekrutierung bestimmter Zellpopulationen in verschiedene Gewebe ist. Chemokine werden anhand konservierter Zysteinreste in CC-, CXC- und XC-Chemokine eingeteilt (Anhang, Tabelle 1) und zeigen meist eine Bindung an mehrere spezifische Rezeptoren, wirken pleiotrop und vermitteln sowohl agonistische als auch antagonistische Signale [16, 17]. Um eine Überwachung der Haut durch Zellen des Immunsystems zu ermöglichen, vermitteln Chemokine wie CCL1, CCL27, CXCL12 und CXCL14 eine homöostatische Migration [156, 157]. Liegt jedoch ein Entzündungsreiz in der Haut vor, werden eine Reihe von Chemokinen

*de novo* synthetisiert. Interessanterweise zeigen Keratinozyten von Patienten mit atopischem Ekzem eine deutlich höhere Produktion von Chemokinen und Zytokinen gegenüber Keratinozyten gesunder Individuen oder Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis. Als Beispiel hierfür können die vermehrte Expression von CCL5 nach IFN- $\gamma$ - oder TNF- $\alpha$  Stimulation oder die spontane oder durch IL-1 oder IFN- $\gamma$  induzierte GM-CSF Überexpression angeführt werden [66, 135]. Zudem konnten beim atopischen Ekzem folgende Chemokine in erhöhter Konzentration in der Haut bzw. im Serum nachgewiesen werden: CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, CCL20, CCL22, CCL24, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CX3CL1. Marker für Eosinophile (ECP) und Chemokine, die die Rekrutierung von Eosinophilen (Eotaxin) bzw. T<sub>H</sub>2 Zellen (CCL17, CCL18, CCL22, CCL27) ins Gewebe bewirken, korrelieren mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung [77, 82, 86, 93-95]. Möglicherweise ist die erhöhte Menge an aktivierten Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie, c-Jun, JunB und c-Fos, in ‚atopischen‘ Keratinozyten an dieser Fehlregulation beteiligt. AP-1 Transkriptionsfaktoren werden über Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-4 und TNF- $\alpha$ , aktiviert und stimulieren die Transkription von verschiedenen Zytokin-Genen, u.a. des CCL5- und GM-CSF Gens [136, 160]. Die Störung der Barriere regt zudem die Sekretion von CCL20 in Keratinozyten an, die wiederum zur vermehrten Infiltration von CCR6<sup>+</sup> DZ und T-Zellen in die Haut führt [160]. So können die vermehrte Produktion von Chemokinen und Zytokinen in normaler und inflammatorischer Haut von Patienten, die erhöhte Neigung zur Entzündung durch die Wirkung der AP-1 Transkriptionsfaktoren und die gestörte Barriere zu einer immer fortschreitenden Amplifikation der Immunreaktion in der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem führen.

### 1.3.3.3 Genetische Assoziationen beim Ekzem

Die Familienanamnese bei Patienten mit atopischem Ekzem ergibt meist das Auftreten von allergischen Erkrankungen unter den nächsten Verwandten, was eine erbliche Komponente dieser Erkrankung wahrscheinlich macht. In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Kandidatengen identifiziert werden:

Es zeigten sich Assoziationen mit den Genregionen für die T<sub>H</sub>2 Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF (5q31-33) [58], für den IL-4 Rezeptor (16p11.2-12) [98] und die  $\beta$ -Kette des hochaffinen IgE Rezeptors Fc $\epsilon$ RI (11q13) [43]. Zudem konnten Varianten im IL-13 Gen und

funktionelle Mutationen im RANTES Gen identifiziert werden [98]. All diese Veränderungen könnten zur Dysbalance zwischen  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen in der Immunantwort bei Patienten mit atopischem Ekzem beitragen.

Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten mit atopischem Ekzem eine gestörte Hautbarriere aufweisen, die u.a. durch Nullmutationen im Filaggrin Gen (1q21) entsteht [170, 197]. Filaggrin ist ein wichtiger Bestandteil des epidermalen Differenzierungskomplexes und übernimmt in der Epidermis die Aufgabe der Bündelung der Keratin-Filamente in der Grenzschicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum, die schließlich zur Ausprägung der Horn-Barriere-Schicht führt, die unseren Körper effektiv gegen die Umwelt abgrenzt. Die Tatsache, dass eine Assoziation der Filaggrin Mutation ausschließlich mit dem atopischen und nicht mit dem nicht-atopischen Ekzem gefunden wurde, legt den Schluss einer Korrelation zwischen Filaggrin Mutation und allergischer Sensibilisierung nahe [197].

Einen weiteren Beitrag zur Störung der Barriere liefert der verringerte Ceramidgehalt der Haut, der zu einem gesteigerten transepidermalen Wasserverlust mit ausgeprägter Xerosis führen kann [40].

Die Mutationen im Filaggrin Gen und die Veränderung der Lipidkomponenten könnten bei Patienten mit atopischem Ekzem zu einer vermehrten Penetration von Allergenen bis in tiefe Hautschichten führen und dadurch einerseits über die FcεR vermittelte Stimulation von Mastzellen die Freisetzung von Histamin und Juckreiz induzieren und andererseits eine Sensibilisierung über die Haut mit vorherrschenden  $T_H2$  Zytokinprofil erleichtern [175, 177].

#### 1.3.3.4 Besiedelung der Haut mit Mikroorganismen

Einen wichtigen Punkt in der Pathogenese des atopischen Ekzems nimmt die Besiedelung der Haut mit verschiedenen Mikroorganismen ein. Das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* besiedelt sowohl die läsionale als auch die nicht-läsionale Haut von etwa 90% der Patienten. Dieser Keim kann durch eine erhöhte Ceramidase-Aktivität die Barrierestörung der Haut noch weiter vorantreiben [127] und durch die Sekretion der Enterotoxine SEA, SEB, SEC und SED einerseits eine Sensibilisierung auslösen und andererseits durch deren Wirkung als Super-Antigen Immunreaktionen in der Haut unspezifischerweise durch Verknüpfung von MHC-Molekülen und TZR amplifizieren [18]. Keratinozyten von Patienten mit atopischem Ekzem sind zudem nicht in der Lage Defensine in ausreichender Menge zu produzieren, um die Ansiedelung von Bakterien zu verhindern [128]. Dieser Defekt in einem angeborenen

Immunmechanismus könnte auch die Vermehrung eines weiteren ubiquitären Keimes auf der Haut fördern, *Malassezia sympodialis*. Dieser Hefepilz umgibt sich mit einer Lipidkapsel, die ihn nicht-immunogen erscheinen lässt; auf der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem allerdings liegt eine Lipidmangelsituation vor, die die Ausprägung dieser Lipidkapsel einschränkt und so Keratinozyten zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und zur Induktion einer Immunreaktion anregt [159]. Dieser Mechanismus führt zu einer zusätzlich gesteigerten inflammatorischen Bereitschaft beim atopischen Ekzem.

### 1.3.3.5 Autoantikörper in der Pathogenese des atopischen Ekzems

Neben den genannten genetischen und immunologischen Dysfunktionen existieren weitere Einflussfaktoren in der multifaktoriellen Pathogenese des atopischen Ekzems: so können Nahrungsmittel unabhängig von deren Allergengehalt eine Verschlimmerung der Ekzempläsion bewirken, neuroimmunologische und psychische Einflussfaktoren exazerbierend wirken und Stillen das Auftreten und die Intensität des atopischen Ekzems positiv modulieren [145]. Interessant scheint der Aspekt der IgE-Autoreaktivität und das Vorkommen von autoreaktiven T-Zellen bei dieser Erkrankung zu sein. So konnten Mossabeb et al. eine Autoreaktivität von IgE-Antikörpern bei Patienten mit atopischem Ekzem gegen  $\alpha$ -NAC („ $\alpha$  – nascent polypeptid-associated complex“) identifizieren. Weiterführende Arbeiten zeigten eine Sensibilisierung von 20% der Patienten gegen  $\alpha$ -NAC und die Existenz von  $\alpha$ -NAC-spezifischen  $CLA^+CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen, die eine Rolle im Ekzem spielen können [80, 114].

### 1.3.3.6 Rolle von APZ in der Pathogenese des atopischen Ekzems

Für die Induktion einer primären Immunantwort scheinen LZ im atopische Ekzem entscheidend zu sein. Allergen-stimulierte LZ induzieren bei Patienten vermehrt die Differenzierung von naïven T-Zellen in Richtung  $T_H2$  Zellen [175]. Eine weitere wichtige Funktion von LZ in der Pathogenese des atopischen Ekzems ist die von inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen, IDEC, in die Haut. IDEC tragen wie LZ den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI auf ihrer Oberfläche, sind jedoch in gesunder Haut und allergischen Kontaktläsionen im Unterschied zu LZ nicht detektierbar [25, 202]. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion infiltrieren diese Zellen sehr schnell, bereits 24 Stunden nach

Pollenkontakt in die Haut [54] und sezernieren nach Aktivierung über den FcεRI proinflammatorische Zytokine, wie IL-1α und IL-1β und Chemokine, die die Immunreaktion amplifizieren; zudem könnten IDEC durch die Produktion von IL-12 und IL-18 einen Anteil an der Umkehr der anfänglichen T<sub>H</sub>2 zu einer späteren T<sub>H</sub>1 dominierten Reaktion beteiligt sein [11, 125].

Eine weitere Population von DZ, die plasmazytoiden DZ (pDZ), die ebenfalls durch den hochaffinen IgE Rezeptor gekennzeichnet ist, liegt im Vergleich zu anderen entzündlichen Hauterkrankungen, wie Psoriasis vulgaris und Lupus erythematosus, beim atopischen Ekzem in verminderter Anzahl vor [203]. Die von Wollenberg et al. berichtete verringerte Zahl an pDZ im Vergleich zur allergischen Kontaktdermatitis konnte von Eyerich et al. jedoch nicht reproduziert werden [54, 55]. Diese pDZ sind üblicherweise in die virale Abwehr durch Produktion von Typ1 Interferonen eingebunden. Auch die Funktion der pDZ ist im atopischen Ekzem gestört: so schütten diese nach Aktivierung über den IgE-Rezeptor weniger Typ I-Interferone aus und könnten einen Anteil an der erhöhten Suszeptibilität von Patienten mit atopischem Ekzem auf virale Infektionen haben [123, 203].

### 1.3.3.7 Rolle von T-Zellen im atopischen Ekzem

In der initialen Phase des atopischen Ekzems infiltrieren hauptsächlich T<sub>H</sub>2 Zellen über die von Keratinozyten und APZ im Gewebe exprimierten Chemokine CCL17 und CCL22 in die Haut. Das von T<sub>H</sub>2 Zellen produzierte IL-4 induziert in gewebsansässigen APZ CCL18, das die weitere Infiltration von T-Zellen amplifiziert [77, 139]. In der späteren Phase des atopischen Ekzems kommt es zu einer Infiltration von T<sub>H</sub>1 Zellen. Dies wird u.a. induziert durch das von T<sub>H</sub>2 sezernierte IL-4, das in Zusammenwirken mit IFN-γ, in Keratinozyten die Sekretion der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 anregt, die schließlich einen vermehrten Influx von T<sub>H</sub>1 Zellen zur Folge haben [9] (Abb. 6).

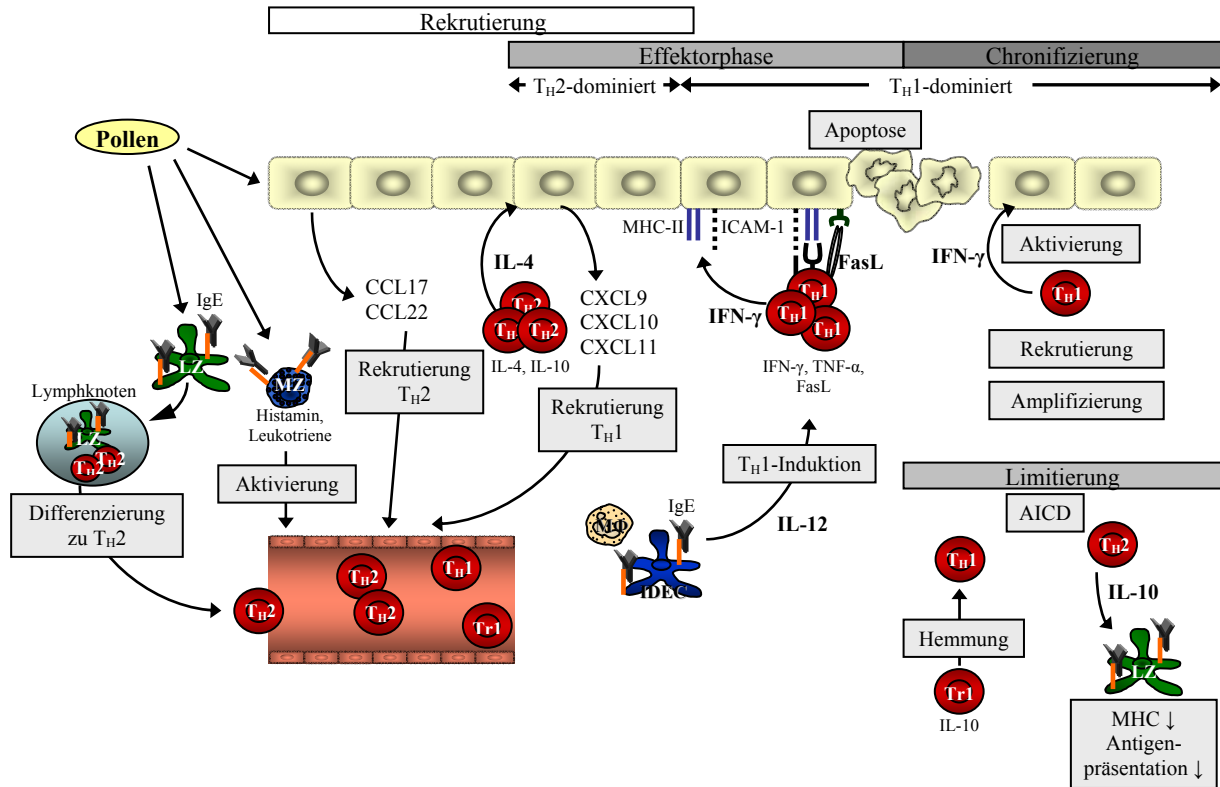
Apoptose von Keratinozyten spielt bei der Pathogenese der Ekzemreaktion eine wichtige Rolle [164]. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Typ1 Zellen in Keratinozyten Apoptose induzieren, wohingegen Typ2 Zellen dazu nicht in der Lage waren [183, 185]. Der programmierte Zelltod des Keratinozyten wird einerseits MHC-abhängig über Fas/FasL Interaktionen und Perforin/GranzymB vermittelt und kann durch die Vorstimulation der Keratinozyten mit IFN-γ, die zur Aufregulation von Fas führt, zusätzlich gesteigert werden [183]. Andererseits können aktivierte T-Zellen zudem auch löslichen FasL

sezernieren und so ohne weiteren Zellkontakt Apoptose über Fas in Keratinozyten induzieren. Dies spielt vermutlich eher in einer bereits bestehenden Immunreaktion eine Rolle, da hierzu Fas auf Keratinozyten durch das von Typ1 Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  auf einen kritischen Schwellenwert von etwa 40 000 Molekülen pro Zellen hochreguliert werden muss [185]. Die durch T-Zellen induzierte Keratinozyten-Apoptose führt zu einer Spaltung der Zellverbindenden E-Cadherin- und der daran assoziierten  $\beta$ -Catenin Moleküle und bewirkt somit eine Lösung der Zellen aus dem Zellverband und die Schwamm-artige Histologie der Ekzem Läsion, die als Spongiose bezeichnet wird [186].

Typ2 Zellen inhibieren im Zusammenspiel mit Typ1 Zellen *in vitro* die Apoptose von Keratinozyten und haben ähnlich wie bei der allergischen Kontaktdermatitis eine regulatorische Funktion [185].

Im Gegensatz zur allergischen Kontaktdermatitis, die ohne weiteren Allergenkontakt abheilt, kann ein atopisches Ekzem chronifizieren. Grund hierfür könnte u.a. ein Defekt im regulatorischen T-Zellkompartiment sein, jedoch sind die Daten diesbezüglich widersprüchlich. Ou et al. berichten über eine erhöhte Frequenz von natürlich auftretenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu gesunden Kontrollen oder Asthmatikern. Diese regulatorischen Zellen sind durch die Expression von CLA befähigt in die Haut einzuwandern, treffen jedoch dort auf Superantigen (SEB) von Staphylococcus aureus, der in 90% der Patienten mit atopischem Ekzem die Haut besiedelt, und verlieren dadurch ihren Status als regulatorische Zelle. Ein Nachweis über das Vorkommen der Zellen in der Haut fehlt in dieser Arbeit. [130]. Verhagen et. al postulieren in *in situ* Arbeiten, dass natürlich auftretendene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Haut fehlen, wohingegen induzierbare IL-10 produzierende T-Zellen anwesend sind. IL-10 produzierende Tr1 Zellen alleine sind jedoch nicht in der Lage die von T<sub>H</sub>1 bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierte Apoptose zu unterbinden. Somit scheint das Fehlen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population in der Haut ein entscheidender Faktor für die beobachtete Dysregulation der Entzündung während der ekzematösen Reaktion zu sein [190].





**Abb. 6 : Immunmechanismus des atopischen Ekzems**

Pollen gelangen auf die Haut und können durch die Freisetzung von Allergenen sowohl IgE tragende LZ zur Allergen-Aufnahme/Präsentation aktivieren und so zur präferentiellen Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>2 Zellen als auch Mastzellen zur Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen und der damit verbundenen Aktivierung des lokalen Endothels anregen. Durch die Wirkung von IL-4/IFN-γ und IL-12 kommt es in einer späteren Phase der Reaktion jedoch zu einer gesteigerten Wanderung von T<sub>H</sub>1 Zellen, die schließlich, aufgrund der unzureichenden regulatorischen Mechanismen, den Hauptbeitrag zur Schädigung von Keratinozyten und der Barriere, sowie zur Amplifizierung und Chronifizierung der Reaktion leisten.

## 1.4 Interaktionen zwischen Keratinozyten und T-Zellen in ekzematösen Reaktionen

Keratinozyten repräsentieren den Hauptanteil der in der Epidermis ansässigen Zellen und bilden die Barriere aus, die den Organismus täglich vor schädlichen Umwelteinflüssen schützt. In den letzten Jahrzehnten wurde immer deutlicher, dass Keratinozyten mehr sind als Zellen, die nur für die strukturelle und physikalische Integrität der Haut zuständig sind. Sie beeinflussen aktiv viele Funktionen der Haut, wie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Wachstum und Differenzierung, Wundheilung und Abwehr von Mikroorganismen

und induzieren durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  Immunreaktionen in der Haut. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und der IL-1 Rezeptorantagonist IL-1RA werden von Keratinozyten als Reaktion auf Zellschädigung oder Haptene sezerniert. IL-1-RA ist strukturell verwandt mit IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , induziert jedoch bei Bindung an den IL-1 Rezeptor kein Signal. Das Verhältnis zwischen proinflammatorischem IL-1 $\alpha/\beta$  zu antiinflammatorischem IL-1RA ist entscheidend bei der Induktion von Immunreaktionen in der Haut [26, 73]. IL-1 wirkt zudem in autokriner Weise auf Keratinozyten und induziert so die Expression weiterer Zytokine und Chemokine wie z.B. IL-6 und GM-CSF. GM-CSF ist beteiligt an der Entwicklung von DZ und der Regulation ihrer Aktivität, aber auch als mitogener Faktor an der Proliferation von Keratinozyten [29, 135]. Über die Sekretion von CXCL8, CXCL1, CCL20 und IL-18 können Keratinozyten Neutrophile Granulozyten und LZ in die Haut rekrutieren, die für die Initiierung einer Immunreaktion entscheidend sind [38, 49]. Das Wissen über Mediatoren, die von Keratinozyten freigesetzt werden, wächst stetig und umfasst neben Chemokinen und Zytokinen auch Defensine, Neuropeptide/Neurotransmitter, Proteasen und Oberflächenmoleküle.

Keratinozyten sind entscheidend in die Immunreaktionen der Haut eingebunden und stellen eine Schaltstelle für von außen und von innen kommende Signale dar, die in für das Immunsystem relevante Mediatoren umgesetzt werden und einen Einfluss auf die Induktion und die Immunpathologie von Entzündungsreaktionen in der Haut haben. Der Pathomechanismus der allergischen Kontaktdermatitis und des atopischen Ekzems wird so entscheidend durch die Kommunikation zwischen Keratinozyten und infiltrierenden T-Zellen über wechselseitig produzierte Faktoren beeinflusst. Diese Interaktionen zwischen T-Zellen und Keratinozyten sollen im Folgenden betrachtet werden.

#### 1.4.1 Effekte von T-Zellen und T-Zell Mediatoren auf Keratinozyten

T-Zellen sind in der Haut meist unter pathologischen Bedingungen anzutreffen, die, wie für die allergische Kontaktdermatitis und das atopische Ekzem erläutert wurde (1.3.2.2 bzw. 1.3.3.6), im Tod des Keratinozyten durch Apoptose resultieren und zur klinischen Symptomatik der Ekzemreaktion leiten. Dieser programmierte Zelltod der Keratinozyten wird u.a. durch die Moleküle FasL oder TRAIL vermittelt [142, 183]. Jedoch scheint TRAIL mehr

zu sein als ein Vermittler des Todes, denn die Gruppe um Vassina konnte zeigen, dass TRAIL stimulierte Keratinozyten, die Expression des anti-inflammatorischen IL-1RA erhöhen [189]. Keratinozyten sind jedoch nicht nur das Opfer von T-Zellen, sondern sie reagieren auch auf von diesen freigesetzte Stimuli:

**IFN- $\gamma$ :** Keratinozyten exprimieren konstitutiv den IFN- $\gamma$  Rezeptor und das T<sub>H</sub>1 Zytokin IFN- $\gamma$  ist wohl der T-Zellfaktor, der am meisten Einfluss auf Keratinozyten zeigt. IFN- $\gamma$  induziert die Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1, sICAM-1, MHC-Klasse I und II, CD40, die eine Rolle in der direkten Wechselwirkung mit T-Zellen haben können: während über ICAM-1 eine Adhäsion zwischen Keratinozyt und T-Zelle ermöglicht wird, scheint die Produktion von löslichem ICAM-1 (sICAM-1) einen Anteil an der De-Adhäsion beider Zellen zu tragen [31]. Der Rezeptor für das Apoptose-vermittelnde Molekül FasL, Fas, wird ebenfalls durch IFN- $\gamma$  auf der Oberfläche induziert und erhöht die Anfälligkeit der Keratinozyten für den programmierten Zelltod [15]. Außerdem sezernieren Keratinozyten auf den Stimulus IFN- $\gamma$  hin eine Reihe von Zytokinen (z.B. IL-1, IL-18, IL-6, IL-15, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) und Chemokinen (z.B. CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CCL22, CXCL8, CX3CR Liganden) mittels denen sie aktiv in das immunologische Geschehen eingreifen können [10, 134].

**IL-13:** IL-13 induziert in Keratinozyten die Expression des T<sub>H</sub>2-attrahierenden Chemokines CCL22, aber auch der T<sub>H</sub>1 Chemokine CCL2 und CCL5. IL-13 könnte so in einer frühen Phase der atopischen Ekzemreaktion zur Infiltration von T<sub>H</sub>2 Zellen und in der chronischen Phase synergistisch mit IFN- $\gamma$  zur Rekrutierung eines eher T<sub>H</sub>1 dominierten, aber gemischten T-Zellpools führen [141].

**IL-4:** Das von T<sub>H</sub>2 Zellen produzierte IL-4 regt zusammen mit IFN- $\gamma$  interessanterweise die Sekretion von T<sub>H</sub>1 Chemokinen wie CXCL9, CXCL10, CXCL11, in Keratinozyten an und ist im atopischen Ekzem so möglicherweise ein wichtiger Faktor in der Änderung des Zytokinprofils von einer anfänglichen T<sub>H</sub>2 zu einer späteren T<sub>H</sub>1-dominierten Immunreaktion [9].

**IL-17:** IL-17 wird von in die Haut infiltrierenden T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen produziert und bewirkt in Keratinozyten die Expression von ICAM-1, GM-CSF, Gro- $\alpha$ , IL-6 und CXCL8

[7]. Interessanterweise reagieren IFN- $\gamma$ -stimulierte Keratinozyten mit einer Herunterregulation von CCL5 und TNF- $\alpha$  bewirkt in Keratinozyten eine verminderte Expression von CCL27 in der Gegenwart von IL-17, wodurch diesem Zytokin in der Haut möglicherweise eine anti-inflammatorische Rolle zukommt [8, 96].

Keratinozyten reagieren aber auch auf Stimuli aus der Umwelt, so konnte gezeigt werden, dass Nickelsulfat in ähnlicher Weise auf Keratinozyten wirkt wie IFN- $\gamma$  indem es die Expression von ICAM-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, TNF- $\alpha$ , CCL2 und CCL5 in Keratinozyten erhöht [67, 74, 75]. Wie Nickel die Expression dieser Moleküle induziert ist noch unklar, jedoch konnte in Endothelzellen [193], bronchialen Epithelzellen [50], Monozyten [106] und DZ [45] eine Aktivierung von NF $\kappa$ B als Reaktion auf Nickel identifiziert werden.

Der Keratinozyt scheint somit ein wichtiger Sensor zu sein, der die Natur des Allergens erkennt und daraufhin eine Immunreaktion induziert, die im Falle des atopischen Ekzems auf z.B. Pollen jedoch fehlreguliert ist.

#### 1.4.2 Effekte von Keratinozyten auf T-Zellen

Einer der wichtigsten Effekte von Keratinozyten auf T-Zellen ist deren Rekrutierung in die Haut. Durch die Produktion verschiedener Chemokine werden sowohl T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen als auch CD8<sup>+</sup> zytotoxische und regulatorische T-Zellen durch Keratinozyten in die Haut dirigiert.

Keratinozyten können durch die Wirkung proinflammatorischer Stimuli, wie z.B. IFN- $\gamma$ , zur Expression von HLA-DR und ICAM-1 angeregt werden, die eine Adhäsion von T-Zellen und prinzipiell eine Peptid-Erkennung ermöglichen. Darüber hinaus produzieren sie konstitutiv das kostimulierende Molekül CD80 (B7-1), das während einer Entzündungsreaktion in der Haut wie bei Psoriasis, atopischem Ekzem oder Kontaktreaktionen, vermehrt exprimiert wird [168]. Ob über das Zusammenspiel der HLA-DR und kostimulierenden Moleküle eine Präsentation von Allergenen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen möglich ist und Keratinozyten somit als nicht-professionelle APZ fungieren können, bleibt in der Literatur noch weitgehend unbeantwortet. Die Gruppe um Gaspari zeigte bereits 1988, dass murine, MHC-Klasse II<sup>+</sup> Keratinozyten in der Lage sind, mehrfach vorstimulierte allogene T-Zellen (T-Zelllinie) zur Proliferation anzuregen, dass sie aber in unstimulierten T<sub>H</sub>1 Klonen Anergie induzieren [60, 61]. Der

Befund der Anergieinduktion durch HLA-DR<sup>+</sup> Keratinozyten konnte auch im humanen System gezeigt werden [19]. Neue Hinweise auf Keratinozyten als APZ gab es 2003 in einem transgenen Mausmodell [56]. In diesem Modell wurden Mäuse, die Keratin 14 im Thymus exprimierten und Mäusen, deren T-Zellen einen transgenen TZR für Keratin 14 aufwiesen, gekreuzt. Die Expression des Keratinozytenmarkers Keratin 14 führte zu einer positiven Selektion der Keratin 14 transgenen T-Zellen und zu einer spontanen Entzündungsreaktion der Haut. Als mögliche APZ in der Haut fungierten hier Keratinozyten.

Ein interessanter Hinweis auf die Rolle der CD80 Expression im atopischen Ekzem findet sich in einem Artikel von Burns et al., der dem CD80 Molekül eine Rolle bei der Bildung von Hapten-spezifischem IgE auf Kontaktallergene bei der Induktion einer T<sub>H</sub>2 Antwort auf T<sub>H</sub>1 Antigene zuweist [33]. Die Gene der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 liegen in der Region des Chromosoms 3q21, die eine deutliche Assoziation mit dem atopischen Ekzem aufweist [104]. Keratinozyten könnten somit über die Kostimulation der infiltrierenden aktivierten T-Zellen ein anfängliches T<sub>H</sub>2 Milieu generieren, das für das atopische Ekzem bereits beschrieben ist [54].

Keratinozyten scheinen daher nicht zur Induktion primärer Immunantworten befähigt zu sein, können aber bestehende Reaktionen über die Stimulation der T-Zellen mit MHC-II und CD80 amplifizieren und modulierend auf die Immunreaktion wirken.

Keratinozyten können durch die Produktion von Zytokinen zudem in die Differenzierung von T-Zellen eingreifen:

**IL-15:** Dieser Wachstumsfaktor für T-Zellen wird von Keratinozyten sezerniert und für das verlängerte Überleben von T-Zellen in unterschiedlichen Hauterkrankungen verantwortlich gemacht [150].

**IL-12:** Die Untereinheit des IL-12 Moleküls p35 wird von Keratinozyten konstitutiv exprimiert, wohingegen die p40 Untereinheit durch z.B. Kontaktallergene induziert werden kann [118]. Das von Keratinozyten produzierte IL-12 kann einen Beitrag zur Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1 leisten oder durch verringerte Produktion die Immunantwort in Richtung T<sub>H</sub>2 lenken.

**IL-18:** Das Mikromilieu ist für die Wirkung von IL-18 entscheidend; so konnte gezeigt werden, dass IL-18 zusammen mit IL-12 die IFN- $\gamma$  Produktion und die Expression des IL-12R- $\beta$ 2 in T-Zellen und somit einen T<sub>H</sub>1 Phänotyp induzieren kann. In der Abwesenheit von IL-12 induziert IL-18 im Mausmodell die Differenzierung von T<sub>H</sub>2 Zellen [51, 119]. IL-18 wirkt jedoch auch auf Keratinozyten selbst und induziert die Expression von MHC-Klasse I und II Molekülen und des T<sub>H</sub>1 Chemokins CXCL10 [201]. IL-18 kann somit modulierend auf die Differenzierung von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen wirken und zu einer Infiltration von T<sub>H</sub>1 Zellen in die Haut führen.

**IL-23:** Das von Keratinozyten produzierte IL-23 induziert die IFN- $\gamma$  Produktion in Effektor/Gedächtnis T-Zellen und leitet so zu einer T<sub>H</sub>1-dominierten Immunantwort. Eine Überexpression konnte in Psoriasis-Läsionen ermittelt werden [138]. IL-23 wurde zudem eine Rolle in der Differenzierung von T<sub>H</sub>17 Zellen und der Induktion der IL-17 Produktion zugeschrieben [46].

Die Vielfältigkeit der Moleküle, die von Keratinozyten produziert werden und zu erwartende Entdeckung weiterer Moleküle, lassen die Rolle der Keratinozyten/T-Zellinteraktion zu einem spannenden Forschungsfeld werden, das großen Einfluss auf die Entwicklung von Therapiestrategien haben wird.

## 2. Ziel der Arbeit

Der Begriff Ekzem beschreibt eine Gruppe von Syndromen die durch eine Kombination von Immun-Dysregulation und epidermaler Barriere-Dysfunktion charakterisiert ist. Dies führt zur Ausprägung der klinischen Symptomatik die durch ein schuppenartiges Erythem und Papeln gekennzeichnet ist und von intensivem Juckreiz und kutaner Hyperreaktivität begleitet wird. Das atopische Ekzem und die allergische Kontaktdermatitis gehören zu den häufigsten ekzematösen Erkrankungen. Ein kritischer Schritt in der Pathogenese allergisch ekzematöser Erkrankungen scheint die Induktion von Apoptose in Keratinozyten durch Allergen-spezifische T-Zellen zu sein. Dies führt zu einem konsekutiven Verlust der Zellintegrität mit nachfolgender Spongiose und den klinischen Symptomen des Ekzems. Der Verlauf dieser T-Zell vermittelten Immunreaktion wird kritisch durch das Mikromilieu beeinflusst. Es ist sehr wahrscheinlich, dass im Verlauf des atopischen Ekzems lokal wirkende Mediatoren eine zentrale Rolle bei der Umkehr der initial  $T_H2$  dominierten Immunantwort hin zu einem  $T_H1$  Profil der chronischen Läsion spielen. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Keratinozyten die Fähigkeit besitzen auf eine Vielzahl von internen und externen Stimuli zu reagieren. Wechselwirkungen zwischen den beiden Hauptspielern der Ekzemreaktion – Keratinozyten und T-Zellen – wurden jedoch bisher fast ausschließlich unter dem Aspekt der Apoptoseinduktion in Keratinozyten untersucht. Zum bisherigen Stand der Forschung ist nicht bekannt, wie und ob Keratinozyten die T-Zell Aktivität beeinflussen.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten daher folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es einen wechselseitigen zellulären Diskurs zwischen T-Zellen und Keratinozyten? Wenn ja:
2. Sind Keratinozyten in der Lage Effektorfunktionen von T-Zellen zu modulieren?
3. In welcher Weise wirken Keratinozyten immunmodulierend auf T-Zellen?

Zunächst soll in lichtmikroskopischen Interaktionsstudien die Wechselwirkung von Keratinozyten und T-Zellen näher charakterisiert werden (1). Im Weiteren sollen autologe *in*

*in vitro* Modelle der allergischen Kontaktdermatitis und des atopischen Ekzems etabliert werden und die modulierende Kapazität von Keratinozyten auf die T Zell Effektorfunktionen – Proliferation und Zytokinproduktion – im Rahmen dieser Modelle analysiert werden (2). Abschließend soll der Mechanismus der Keratinozyten abhängigen Modulation von T-Zell Effektorfunktionen durch experimentelle Variation der etablierten *in vitro* Modelle geklärt werden (3).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zum erweiterten Verständnis der Ekzemreaktion beitragen und Keratinozyten aus dem Licht der reinen Zielzelle hin zu einer aktiv agierenden Zelle des Mikromilieus der Haut rücken.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Substanzen

Substanzen	Bezugsquelle	Best.nr.
antiCD4-FITC Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg	555 346
antiCD8-PE Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg	555 635
antiCD3 Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg	555 329
antiCD28 Antikörper	BD Biosciences, Heidelberg	555 752
Adenin	Sigma, München	A-9795
„Antibiotic-Antimycotic Solut.“	PAA, Linz, Österreich	P 11-002
Aqua ad injectabilia	Delta-Select, Pfullingen	EDS192F-607
CFSE	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	C-1157
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Baker, Griesheim	7157
DMEM	Invitrogen, Paisley, Schottland	41966-029
DPBS Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland	14040174
DPBS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland	14190094
EDTA	Sigma, München	ED4SS
EDTA 0,5M	Invitrogen, Paisley, Schottland	15575-020
ELISA Kit (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10)	BD Biosciences, Heidelberg	555 142/194/157
“Epidermal growth factor”, EGF	Sigma, München	E-4127
Gentamycin	Invitrogen, Paisley, Schottland	15710049
Glucose	Sigma, München	G-7528
rGM-CSF	Immunotools, Friesoythe	11133125
HAM's F12	Sigma, München	N-6760
HBSS w/o Ca/Mg	Invitrogen, Paisley, Schottland	24020-091
Heparin-Natrium 250.000U	Ratiopharm, Ulm	X68541.02
Humanes rekombinantes IFN- $\gamma$	R&D, Wiesbaden	

MATERIAL UND METHODEN

Humanes Serum	Invitrogen, Paisley, Schottland	H4522
Hydrocortison	Sigma, München	C-31059
Insulin	Sigma, München	C-31010
rIL-2	Chiron, Proleukin	
rIL-4	Immunotools, Friesoythe	11133126
Keratinozyten Basalmedium	Promocell, Wien, Österreich	C-20211
L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland	25030-024
Lymphoprep	Progen Biotechnik, Heidelberg	111 4547
MACS Beads CD8	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	120-000-440
MACS Beads CD4	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	120-000-244
Mitomycin C	Sigma, München	037K1522
Na-Pyruvat	Invitrogen, Paisley, Schottland	11360-039
Nickelsulfat	Sigma, München	N-4882
“Non-essential Amino Acids”	Invitrogen, Paisley, Schottland	11140-35
2-Mercapto-Ethanol	Sigma, München	M-7522
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Paisley, Schottland	15140130
PHA (Lectin)	Sigma, München	L-9132
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma, München	P-8920
RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, Schottland	31870-025
Transferrin	Sigma, München	T-5391
Trypan Blau 0,4% Lösung	Sigma, München	T-8154
Trypsin 0,05% EDTA	Invitrogen, Paisley, Schottland	2530054

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle	Best.nr.
96-well Mikrotiterplatten T-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark	167008
96-well Mikrotiterplatten U-Form steril	Nunc, Roskilde, Dänemark	163320
96-well Mikrotiterplatten für ELISA	Nunc, Roskilde, Dänemark	449824
24-well Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark	280933
6-well Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark	108037
Chamber Slide	Nunc, Roskilde, Dänemark	155411
Clustertubes 1,2ml	Abgene, Surrey, UK	AB-0672

Cryoröhrchen 1,8ml Außengewinde	Nunc, Roskilde, Dänemark	375418
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht	02/1066.001
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg	0030 015.002
Fadenschere Aesculap	Braun Melsungen, Melsungen	BC107R
Falcon Röhrchen 15 ml	Becton Dickinson, NJ, USA	352070
Falcon Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, NJ, USA	2096
“Heat sealing paper”	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim	1450-467
Kapillarspalt-Objektträger 100µm	Dako, Hamburg	S2025
LS-Säulen (MACS)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach	130-041-306
Mikroschraubröhre 2ml PP steril	Sarstedt, Nümbrecht	72.694.006
Melti Lex TMA (β-Counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim	1450-441
Printed Filtermat A (β-Counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim	1450-421
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht	02.1063.500
Sterilfiltereinheiten 250ml	Nalgene, Rochester, USA	1680020
Sterilfiltereinheiten 500ml	Millipore, Billerica, USA	FCGVUO5RE
Sterilfiltereinheiten 500ml	Nalgene, Rochester, USA	1690020
Transwell	Nunc, Roskilde, Dänemark	136730

### 3.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen
Homogenisator Ultra Turrax T25 basic	IKA Werke, Staufen
Lichtmikroskop Aristoplan	Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss, Jena
MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Titramax 100,	Heidolph, Schwabach
Waage MC1Labor	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau

### 3.2 Medien

Alle Medien wurden sterilfiltriert und bei 4-8°C gelagert.

#### Antibiotika-Antimykotika Lösungen

Lösung	Bestandteil	Stammlösung	ml aus Stammlösung
I	DMEM		500ml
	„Antibiotic/Antimycotic Solution“	100x	20ml
	Gentamycin	10mg/ml	15ml
II	Lösung I		250ml
	DMEM		250ml
III	DMEM		250ml
	„Antibiotic/Antimycotic Solution“	100x	2,5ml

Die Antibiotika-Antimycotika Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

#### 3T3 Medium

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
DMEM			445ml
FKS	10%		50ml
Penicillin/Streptomycin	1%	20x	5ml

#### EBV Medium

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
RPMI			429,5ml
FKS	10%		50ml
Glutamin	1%	200mM	5ml
Penicillin/Streptomycin	1%	20x	5ml
„Non-essential amino acids“	1%	100x	5ml
Na-Pyruvat	1%	100mM	5ml
Mercaptoethanol	0,1%	50mM	0,5ml

**Durchflusszytometer Puffer**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
PBS w/o Ca/Mg			450ml
FKS	5%		50ml
Natrium-Azid	0,02%		0,1ml

**Feedermedium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
DMEM			280,5ml
HAM's F12			150ml
Hyclone II	10%		50ml
Glutamin	2%	200mM	10ml
Penicillin/Streptomycin	1%	20x	5ml
Adenin	0,2%	15mg/ml	1ml
Hydrocortison	0,2%	200mg/ml	1ml
Trijodthyronin	0,1%	0,02mg/ml	0,5ml
Choleratoxin	0,1%	0,1nM	0,5ml
EGF	0,1%	0,01mg/ml	0,5ml
Insulin	0,1%	5mg/ml	0,5ml
Transferrin	0,1%	5mg/ml	0,5ml

**FI-Medium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
RPMI			468,5ml
FKS	5%		25ml
Glutamin	1%	200mM	5ml
Gentamycin	0,2%	10mg/ml	1ml
Mercaptoethanol	0,1%	50mM	0,5ml

**HU-DZ Medium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
RPMI			443,5ml
FKS	10%		50ml
Glutamin	1%	200mM	5ml
Gentamycin	0,2%	10mg/ml	1ml
Mercaptoethanol	0,1%	50mM	0,5ml

**Keratinocytenmedium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
Keratinocyten			500ml
Penicillin/Streptomycin	1%	20x	5ml
BPE-15			2ml
Hydrocortison	0,1%	165µg	0,5ml
Insulin 2,5	0,1%	2,5mg	0,5ml
Epinephrin 195	0,1%	195mg	0,5ml
hEGF-0,0625	0,1%	0,0625µg	0,5ml
Transferrin 5	0,1%	5mg	0,5ml
CaCl <sub>2</sub> Lösung	0,1%	0,5M	0,15ml

**Kloniermedium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus
RPMI			404,5ml
FKS	10%		50ml
Humanes Serum	5%		25ml
Glutamin	1%	200mM	5ml
„Antibiotic/Antimycotic Solution“	1%	100x	5ml
„Non-essential amino acids“	1%	100x	5ml
Na-Pyruvat	1%	100mM	5ml
Mercaptoethanol	0,1%	50mM	0,5ml

**MACS Puffer**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
PBS w/o Ca/Mg			473ml
BSA	0,5%	10%	25ml
EDTA	0,02%	0,5M	2ml

**Proliferationsmedium**

Bestandteil	%	Stammlösung	ml aus Stammlösung
RPMI			454,5ml
Humanes Serum	5%		25ml
Glutamin	1%		5ml
Penicillin/Streptomycin	1%	20x	5ml
„Non-essential amino acids“	1%	100x	5ml
Na-Pyruvat	1%	100mM	5ml
Mercaptoethanol	0,1%	50mM	0,5ml

**3.3 Methoden**

**3.3.1 Probandencharakterisierung**

Fünf Probanden (1Ni, 2Ni, 3Ni, 4Ni, 5Ni) mit einer Sensibilisierung gegenüber dem Kontaktallergen Nickel und einer positiven Nickel-Patch Test Reaktion wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Bis auf einen Probanden lagen keine weiteren Sensibilisierung gegenüber Aero- oder Nahrungsmittelallergenen vor. Proband 5Ni hingegen wies zusätzliche eine Monosensibilisierung gegen das „major“ Allergen der Birke, Bet v 1, auf (Rast Klasse 2) mit einem Gesamtanteil von IgE Antikörpern im Blut von 21 kU/l (Tabelle 1).

Zudem wurden zwei Probanden (1p1, 2p1) mit einer Sensibilisierung gegenüber Lieschgras (Phleum pratense) und einer Rast Klasse  $\geq 3$  bezüglich dem „major“ Allergen Phl p 1 einbezogen. Diese Probanden wiesen weitere Sensibilisierungen gegen Aeroallergen wie z.B. Birke, Hausstaubmilbe und Katzenschuppen auf (Tabelle 1).

Proband	Alter (♀/♂)	Allergie	Atopie Status (Totale/spez. IgE-AK (Klasse) in kU/l)	AE	APT	NPT	in vitro Modell	
							AE	ACD
1Ni	29 (♀)	Nickel	17,6/ Phl.>0,35 (0)/Bet.>0,35 (0)	-	-	++++		
2Ni	43 (♀)	Nickel	35/ Phl.>0,35 (0)/ Bet.>0,35 (0)	-	-	+++		
3Ni	28 (♀)	Nickel	22/ Phl.>0,35 (0)/ Bet.>0,35 (0)	-	-	+++		
4Ni	45 (♂)	Nickel	nicht getestet	-	-	+++		
5Ni	29 (♀)	Nickel	21/ Phl.>0,35 (0)/ Bet.>0,85 (2)	-	-	+++		
1p1	29 (♀)	Phleum	275/ Phl.>17,5 (4)/ Bet.>17,5 (4)/ Fel.>3,5 (3)/ Der.>0,7 (2)	-	-	Anamn. negativ		
2p1	28 (♀)	Phleum	149/ Phl.>3,5 (3)/ Bet.>3,5 (3)/ Der.>3,5 (3)/ Fel.>0,7 (2)	-	-	Anamn. negativ		

**Tabelle 1: Charakterisierung der Probanden und Einsatz der Allergen-spezifischen T-Zellen im *in vitro* Modell der Ekzemreaktion**

Phl.: Phleum pratense; Bet.: Betula verrucosa; Fel.: Felidae; Der.: Dermatophagoides pteronyssinus

### 3.3.2 Generierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ)

#### 3.3.2.1 Generierung von Dendritischen Zellen (DZ)

Dendritische Zellen (DZ) wurden aus Monozyten des Spenders durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 generiert. Zunächst wurden periphere Blut mononukleäre Zellen (PBMZ) mittels Dichte-Gradienten Zentrifugation aus humanem Vollblut isoliert und Monozyten durch anschließende Adhärenz (2 Stunden, 37°C, FI Medium) von nicht-adhären Zellen getrennt. Nicht adhären Zellen wurden durch mehrmaliges waschen mit HBSS entfernt. Die adhären Monozyten wurden mit einem Zytokin-Cocktail (je 500 U/ml GM-CSF und IL-4) in HU-DZ Medium für fünf Tage inkubiert. Nach drei Tagen fand ein Mediumwechsel mit erneutem Zusatz von Zytokinen statt.

#### 3.3.2.2 Immortalisierung von B-Zellen durch EBV-Transformation

Autologe B-Zellen wurden mit dem Epstein-Barr Virus (HHV-4) infiziert (EBV-transformierte B-Zellen) der an die CD21 Komponente des B-Zell Ko-Rezeptor Komplexes



bindet und B-Zellen in langlebige, proliferierende lymphoblastoide Zellen transformiert. Charakteristisch für EBV-transformierte B-Zellen ist deren EBNA-1 und LMP-1 Expression. Bei EBNA-1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der für die Erhaltung des Virusgenoms und die latente Infektion verantwortlich ist, wohingegen LMP-1 als Protein der Plasmamembran die Signalkaskade von Oberflächenrezeptoren (z.B. TNFR) beeinflusst und so das Überleben und Wachstum der B-Zelle fördert [112].

Zur EBV Transformierung wurden  $10 \times 10^6$  PBMZ in 2 ml EBV Medium aufgenommen und 1 ml Überstand einer EBV-produzierenden Zelllinie (B95.8) zusammen mit 2,5 µg/ml Ciclosporin, zur Unterdrückung des T-Zellwachstums, zugegeben und der Ansatz in einem 5 ml Röhrchen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen mit DPBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  aufgefüllt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml EBV Medium aufgenommen und je 2 ml in eine Vertiefung einer 24-kämmerigen Mikrotiterplatte pipettiert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und eine Teilung der Zellpopulation bei Bedarf. Eine voll bewachsene Mikrotiterplatte wurde in eine T75 Flasche überführt und je nach Bedarf die B-Zellen weiter expandiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.3.3 Isolierung von humanen Allergen-spezifischen T-Zellklonen

Zur Gewinnung Allergen-spezifischer T-Zellklone wurden zunächst PBMZ aus humanem Vollblut von Nickel- bzw. Phleum pratense sensibilisierten Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurden 50 ml heparinisiertes Vollblut mit 50 ml DPBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  verdünnt und jeweils 25 ml der Suspension vorsichtig auf 15ml Lymphoprep geschichtet. Nach der Zentrifugation (15 Minuten, 2200 rpm, ohne Bremse) wurde die PBMZ Bande abgenommen, dreimal in DPBS w/o gewaschen und auf eine Zellzahl von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml in FI-Medium eingestellt. Zur Abtrennung der Monozyten von T-Zellen und B-Zellen wurden 6 ml der PBMZ-Suspension auf eine 10 cm Petrischale gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden abgenommen und durch Positivselektion mittels „Bead“-gekoppelter Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD8 in  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aufgetrennt und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen in Proliferationsmedium eingestellt. Die adhärenen Monozyten wurden nach entfernen der nicht adhärenen Zellen dreimal mit HBSS gewaschen, weitere 30 Minuten in DPBS w/o

mit 2 mM EDTA inkubiert, anschließend mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in Proliferationsmedium auf eine Zellzahl von  $8 \times 10^5$ /ml eingestellt.

#### *Etablierung einer T-Zell Linie*

Um Allergen-spezifische T-Zellen in der  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Subpopulation zu vermehren wurde eine T-Zell Linie angelegt. Hierzu wurden  $1 \times 10^5$   $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen (100  $\mu$ l aus der  $1 \times 10^6$ /ml Zellsuspension) und  $8 \times 10^4$  Monozyten als Antigen-präsentierende Zellen (100  $\mu$ l aus der  $8 \times 10^5$ /ml Zellsuspension) zusammen mit dem jeweiligen Allergen (Nickelsulfat bzw. natives Phl p 1) inkubiert. Nickelsulfat wurde in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml (gelöst in DPBS w/o  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ) und natives Phl p 1 in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml (gelöst in Proliferationsmedium) eingesetzt.

Zur Testung der spezifischen Proliferation der isolierten T-Zellen wurde ein zweiter Ansatz analog zum Ansatz der Linie durchgeführt, der jedoch zusätzlich mit einer Negativkontrolle ohne Allergen. Nach 72 Stunden wurde 10  $\mu$ g/ml radioaktiv markiertes  $^3H$ -Thymidin für 6 Stunden zugesetzt. Dieser Proliferationstest beruht auf der Messung der Mitoseaktivität durch den indirekten Parameter der DNA-Synthese. Radioaktiv markiertes  $^3H$ -Thymidin tritt in Konkurrenz mit dem unmarkierten Nukleotid und wird in neu synthetisierte DNA eingebaut, wobei es nicht zum Kettenabbruch kommt. Proliferierende Zellen mit eingebautem  $^3H$ -Thymidin werden vom radioaktiven Überstand getrennt, indem die Zellsuspension durch einen Filter gesaugt wird, der die Zellen in sich zurück hält aber für das  $^3H$ -Thymidin Molekül durchlässig ist. Der getrocknete Filter wird dann mit einer Szintillationsfolie verschmolzen, die die Radioaktivität für den  $\beta$ -Counter lesbar macht. Das Maß an Radioaktivität auf dem Filter wird in „counts per minute(cpm)“ wieder gegeben, die direkt mit der Menge an neu gebildeter DNA und somit der Proliferationsaktivität der Zellen korreliert.

Zur Bestimmung der spezifischen Proliferation auf das Allergen wurde der Proliferationsindex bestimmt, der sich wie folgt zusammensetzt:

$$PI = \frac{\text{cpm mit Allergen}}{\text{cpm ohne Allergen}}$$

Ein Proliferationsindex  $> 2$  wurde als spezifische Proliferation bewertet.

*Klonierung der Linie und Expansion der T-Zellklone*

Bei einer spezifischen Proliferation der isolierten T-Zellen auf das jeweilige Antigen wurde die angesetzte T-Zell Linie kloniert, d.h. die T-Zellen wurden durch Reihenverdünnung soweit vereinzelt, so dass aus einer Zelle ein T-Zellklon heran wächst, dessen Zellen alle aus einer Mutterzelle hervor gegangen sind und somit identisches Erbgut besitzen.

Zur Klonierung der T-Zell Linie wurden an Tag sieben nach Ansatz der Linie zunächst heterologe PBMZ mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und durch Inkubation mit Mitomycin C (4%, 37°C, 2 Stunden) teilungsunfähig gemacht. Mitomycin C ist ein Spindelgift, das bei der Zellteilung das Auseinanderweichen der autologen Chromosomenpaare während der Metaphase unterbindet und somit die Teilung der Zellkerne und der Zelle verhindert. Diese so teilungsunfähig gemachten Zellen sind noch lebensfähig und dienen den vereinzelt T-Zellen der T-Zell Linie als eine Art „Nährzellen“. Um aber einen Einfluss des Mitomycins auf die zu klonierenden T-Zellen auszuschließen, wurden die PBMZ dreimal in DPBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und anschließend auf eine Zellkonzentration von  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kloniermedium eingestellt und 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension pro Vertiefung einer rundbödigen 96 well Platte ausplattiert. Zur unspezifischen Stimulation der T-Zellproliferation wurde der Lösung teilungsunfähiger PBMZ 2% PHA zugesetzt.

Die aus der T-Zell Linie zu klonierenden  $\text{CD4}^+$  bzw.  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden resuspendiert und auf eine Konzentration von 6 Zellen/ml in Kloniermedium eingestellt. Werden 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension auf die „Nährzellen“ gegeben, entspricht dies einer Verteilung von 0,6 Zellen pro Vertiefung. Zur Unterstützung der T-Zellproliferation wurden 30 U/ml IL-2 zugegeben. Für jede T-Zell Subpopulation ( $\text{CD4}^+$  oder  $\text{CD8}^+$ ) wurden vier 96 well Platten angelegt.

Etwa sieben Tage nach Klonierung waren erste proliferierende T-Zellklone erkennbar. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel, d.h. 100  $\mu\text{l}$  des alten Mediums wurden vorsichtig abgenommen und durch neues Kloniermedium mit zugesetztem IL-2 (20 U/ml bis 80 U/ml final, je nach Vitalität des Klons) ersetzt. Klone, die eine Vertiefung bis zu ca. 70% bewachsen hatten, wurden 1:2 geteilt und weiter expandiert.

### *Spezifitätstest der T-Zellklone*

Die Spezifität der generierten T-Zellklone wurde überprüft, sobald der Klon vier Vertiefungen einer 96 well Platte komplett bewachsen hatte. Hierzu wurde eine Proliferation mit autologen EBV B-Zellen oder autologen DZ und dem jeweiligen Antigen angesetzt.

Zwei Vertiefungen des T-Zellklons wurden resuspendiert, zentrifugiert und in 300 µl Proliferationsmedium aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden entweder mit  $8 \times 10^4$  teilungsunfähigen EBV B-Zellen oder  $5 \times 10^3$  DZ und dem Antigen (20 µg/ml Nickelsulfat oder 10 µg/ml Phl p 1) inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die spezifische Proliferation des T-Zellklons mittels Einbau radioaktiv markierten  $^3\text{H}$ -Thymidins ermittelt.

Die verbleibenden zwei Vertiefungen des Klons wurden mit Mitomycin C behandelten heterologen PBMZ ( $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung, 2% PHA, 20 U/ml IL-2 final) restimuliert und weiter expandiert. Hatten spezifisch proliferierende Klone erneut vier Vertiefungen bewachsen, wurde sie auf eine Vertiefung einer 24 well Platte überführt (Gesamtvolumen 2 ml) und weiter expandiert bis ausreichend Zellen zur Asservierung in flüssigem Stickstoff und für Experimente zur Verfügung standen.

### *Charakterisierung der T-Zellklone*

Die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 wurde in den generierten T-Zellklonen durchflusszytometrisch mittels FACS-Messung mit monoklonalen, Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern bestimmt.

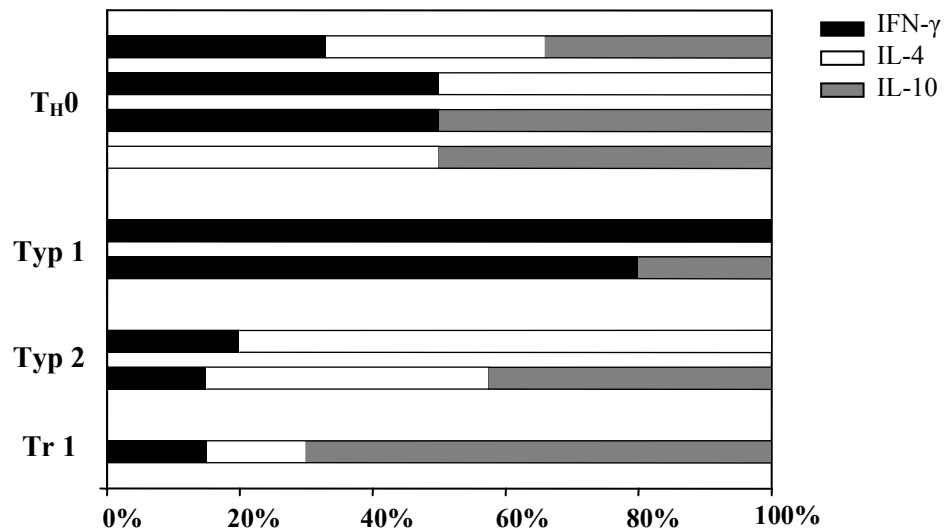
Um eine Aussage über den T-Zellsubtyp der isolierten T-Zellklone machen zu können, wurde deren Zytokinprofil analysiert. Hierzu wurden APZ und T-Zellklone mit dem jeweiligen Antigen inkubiert. Überstände dieser Kultur wurden asserviert und mittels ELISA auf die Allergen-spezifische Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 hin untersucht. Die Summe aller produzierten Zytokine wurde gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil des einzelnen Zytokins an der Gesamt-Zytokinproduktion bestimmt. Von jedem Klon wurden mindestens drei Experimente ausgewertet.

T<sub>H</sub>0 Klone wurden definiert durch eine annähernd gleiche Verteilung aller drei Zytokine oder eine Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 oder IFN- $\gamma$  und IL-4 oder IL-4 und IL-10 zu jeweils 50%.

Als Typ1 Klone (T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>c</sub>1) wurden T-Zellen definiert, die 80% IFN- $\gamma$ , kein IL-4 und weniger als 20% IL-10 produzierten.

Typ2 Klone (T<sub>H</sub>2 bzw. T<sub>c</sub>2) waren entweder charakterisiert durch eine IL-4 Produktion größer 60% mit einer gleichzeitigen IFN- $\gamma$  Produktion kleiner 20% oder durch eine Summe der IL-4 und IL-10 Produktion größer 85%.

Regulatorische T-Zellklone, Tr1, zeichneten sich durch eine IL-10 Produktion größer 65% aus (Abb. 7).



**Abb. 7: Definition der T-Zell Subtypen anhand des Zytokinprofils**

T-Zellklone wurden anhand des gezeigten Schemas in die T-Zell Subtypen T<sub>H</sub>0, Typ1, Typ2 oder Tr1 eingeteilt.

### *CFSE Markierung der T-Zellen*

Neben der <sup>3</sup>H-Thymidin Methode zur Messung der T-Zellproliferation kann auch die CFSE-Markierung der T-Zellen als Nachweis der Teilungsaktivität heran gezogen werden. Das farblose CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) ist hydrophob und membrangängig. In der Zelle werden durch Esterasen die beiden Acetatreste abgespalten und es entsteht das grün fluoreszierende CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidylester). CFSE bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe an Lysin- und Argininreste

cytoplasmatischer Proteine. Die Carboxyfluorescein-markierten Proteine werden bei der Teilung einer Zelle zu gleichen Teilen an ihre Tochterzellen weitergegeben. Die Zahl der Zellteilungen läßt sich daher anhand der Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen.

Die CFSE-Markierung wurde in PBS durchgeführt. Zu  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml wurden  $4 \mu\text{l/ml}$  CFDA-SE (Endkonzentration  $4 \mu\text{g/ml}$ ) gegeben und durch Schwenken schnell mit der Zellsuspension vermischt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert und zweimal in PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft.

### 3.3.4 Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

#### *Vorbereitung der Fibroblastenzellen*

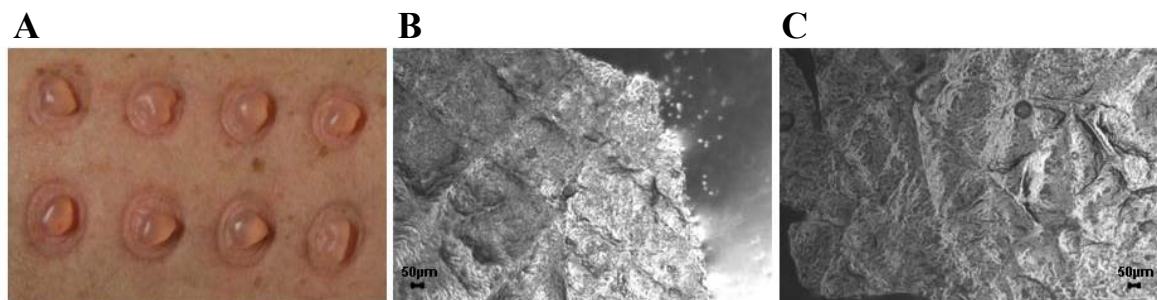
Immortalisierte Maus-Fibroblasten (3T3 Zellen) wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% in T75 Flaschen in 3T3 Medium kultiviert und vor Zugabe der primären Keratinozyten mit einer 2%igen Mitomycin Lösung mitotisch inaktiviert (Inkubation für 2 Stunden,  $37^\circ\text{C}$ ). Anschließend wurden die Fibroblasten mit DPBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst und  $1,5 \times 10^6$  teilungsunfähige Zellen in Feedermedium in eine neue T75 Zellkulturflasche überführt.

#### *Gewinnung humaner primärer Keratinozyten*

Primäre humane Keratinozyten wurden durch die Methode der Saugblasen-Induktion („suction blister“) gewonnen, die erstmals von Kiistalla und Mustakallio 1964 als eine Methode zur Trennung von Dermis und Epidermis beschrieben wurde [99]. Hierzu wird ein Plastikaufsatz mit acht Vertiefungen (Durchmesser 1 cm) auf die desinfizierte Haut des Unter- oder Oberarmes des Probanden aufgelegt und mittels einer Pumpe ein dauerhafter Unterdruck von 400 mbar erzeugt. Zur Unterstützung der Blasenentwicklung wird der Arm mit einer Heizmatte umwickelt, die je nach Wärmetoleranz des Probanden auf  $40-50^\circ\text{C}$  beheizt wird. Nach ca. ein bis zwei Stunden bilden sich Blasen, die mit chirurgischem Besteck abgenommen wurden (Abb. 8, A). Da die Basalmembran bei dieser Prozedur nicht verletzt wird, kommt es zu keiner Narbenbildung.

Die Epidermishäutchen (Abb. 8, B) wurden anschließend in den Antibiotikallösungen I-III für jeweils 20 Minuten desinfiziert, dann in eine Petrischale mit Trypsin/EDTA überführt und

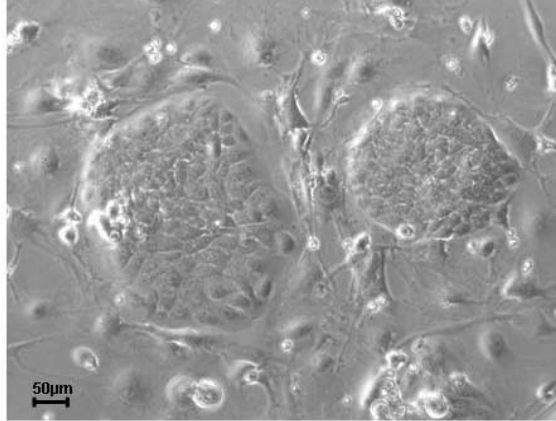
rührend auf einem Magnetrührer für 10 Minuten inkubiert. Die erste Fraktion an abgelösten Keratinozyten wurde in ein 50 ml Röhrchen mit Feedermedium überführt und, um die Adhäsion an das Plastikröhrchen zu unterbinden, auf Eis gestellt. Die verbleibenden Häutchen wurden erneut mit Trypsin/EDTA inkubiert und dieser Vorgang bis zur vollständigen Ablösung der Keratinozyten von der Basalmembran wiederholt (Abb. 8, C). Nach Fraktion fünf wurden die Keratinozyten gezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen auf die vorbereiteten Fibroblastenzellen in einem Volumen von 15 ml Feedermedium gegeben. Mit den weiteren Fraktionen wurde ebenso verfahren.



**Abb. 8: Saugblasen-Induktion**

Die Methode der Saugblasen-Induktion wurde zur Gewinnung von humanen, primären Keratinozyten herangezogen. In (A) sind die induzierten Blasen am Unterarm eines Probanden gezeigt. (B) zeigt lichtmikroskopisch ein Epidermishäutchen, das noch dicht mit Keratinozyten besetzt ist, (C) hingegen ein Häutchen von dem alle Keratinozyten abgelöst wurden.

Drei Tage nach Isolation wurde die Hälfte des Feedermediums durch frisches Medium ersetzt und die Keratinozyten bis zu einer Konfluenz von etwa 90% mit einem Mediumwechsel alle drei Tage weiter kultiviert. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden dann in eine neue T75 Zellkulturflasche mit Mitomycin-behandelten Fibroblasten ( $1,5 \times 10^6$ ) passagiert und erneut bis zu fast vollständiger Konfluenz kultiviert (Abb. 9). Sowohl primär isolierte ( $KP_0$ ), als auch Keratinozyten der ersten Passage ( $KP_1$ ) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.



**Abb. 9: Keratinozyten-Nester auf Fibroblastenrasen**

Lichtmikroskopische Aufnahme zweier proliferierender Keratinozyten-Nester auf Fibroblastenrasen sieben Tage nach Isolation. (Vergrößerung 1:10)

### 3.3.5 Keratinozyten – T-Zell – APZ - Ko-Kultur

#### 3.3.5.1 Allergen für die Ko-Kultur

##### *Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>)*

Nickel wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml in die Kontroll- bzw. Ko-Kultur eingesetzt. Bei dieser Konzentration ist eine optimale Stimulation der T-Zell Proliferation gewährleistet und eine toxische Wirkung auf T-Zellen sowie APZ und Keratinozyten kann ausgeschlossen werden.

##### *Phleum pratense p 1 (Phl p 1)*

Das native „major“ Allergen Phl p 1 wurde aus Pollen des Lieschgrases (*Phleum pratense*) wurde von Prof. Arnd Petersen (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt und in einer Konzentration von 10 µg/ml in die Kontroll- bzw. Ko-Kultur eingesetzt.

#### 3.3.5.2 T-Zellklone für die Ko-Kultur

Spezifische T-Zellklone wurden in flüssigem Stickstoff asserviert und für Ko-Kultur Experimente aufgetaut. Hierzu wurde einen Tag zuvor an die Vertiefungen einer 24 kämmrige



MTP antiCD3 Antikörper (1 µg/ml in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, 4°C, ÜN) gebunden. Die aufgetauten Zellen wurden in 8 ml DPBS w/o aufgenommen, um das DMSO des Einfriermediums zu verdünnen, zentrifugiert und in 1 ml Kloniermedium mit IL-2 (20U/ml final) und antiCD28 Antikörper (1µg/ml) resuspendiert und auf die vorbereiteten Platten gegeben. Das CD3 Molekül ist ein wichtiger Bestandteil des T-Zellrezeptors, der Signal 1 zur Proliferation der T-Zelle übermittelt, das CD28 Molekül bindet an kostimulierende Moleküle der Antigen präsentierenden Zelle und übermittelt Signal 2 zur Proliferation.

Alle zwei Tage fand ein Mediumwechsel mit Zugabe von IL-2 je nach Proliferationsaktivität des Klones statt. Nach Eintritt des Klons in die frühe Ruhephase wurde er in ein Ko-Kultur Experiment eingesetzt. T-Zellklone wurden in Proliferationsmedium auf eine Zellzahl von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und 100 µl (1x10<sup>5</sup> Zellen) dieser Zellsuspension in die Ko-Kultur eingesetzt (Tabelle 2 und 3).

Eine Vertiefung des Klons wurde erneut mit antiCD3/antiCD28 und IL-2 (20U/ml final) restimuliert und für das nächste Ko-Kultur Experiment expandiert.

### 3.3.5.3 Antigen-präsentierende Zellen für die Ko-Kultur

In die Ko-Kultur wurden als APZ alternativ autologe DZ oder autologe EBV B-Zellen eingesetzt (Tabelle 2), die wie unter 3.3.2.1 bzw. 3.3.2.2 beschrieben, generiert wurden. Autologe DZ wurden fünf Tage vor einem Ko-Kultur Experiment entweder frisch isoliert oder durch Auftauen von PBMZ des Spenders aus flüssigem Stickstoff generiert. Am Tag der Ko-Kultur wurden die DZ geerntet und in Proliferationsmedium auf eine Zellzahl von 2x10<sup>4</sup> Zellen/ml eingestellt. 50µl dieser Zellsuspension (entspricht 1x10<sup>3</sup> Zellen) wurden in die Kontroll- bzw. Ko-Kultur eingesetzt (Tabelle 2 und 3). EBV B-Zellen wurden am Tag des Experimentes durch Mitomycin C Behandlung (2% Mitomycin, 2h, 37°C) teilungsunfähig gemacht. Nach dreimaligem waschen mit DPBS w/o wurden die Zellen auf eine Zellkonzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml in Proliferationsmedium eingestellt und 50µl dieser Zellsuspension (entspricht 5x10<sup>4</sup> Zellen) in die Kontroll- bzw. Ko-Kultur eingesetzt (Tabelle 2 und 3).

Ko-Kultur	Kontroll-Kultur	Allergen bzw. Zellen	Konz. final	Konz. Stock	Volumen aus Stock
		Nickelsulfat	20 µg/ml	200 µg/ml	20µl
		Nickel-spez. T-Zellklon	1x10 <sup>5</sup> Zellen	1x10 <sup>6</sup> Zellen	100µl
		DZ oder EBV B-Zellen	1x10 <sup>3</sup> Zellen 8x10 <sup>4</sup> Zellen	1x10 <sup>4</sup> Zellen 8x10 <sup>5</sup> Zellen	50µl 50µl
		Keratinozyten	1x10 <sup>4</sup> Zellen	2x10 <sup>5</sup> Zellen	50µl

Tabelle 2: Kontroll- bzw. Ko-Kultur Ansatz für das *in vitro* Modell der allergischen Kontaktdermatitis

Ko-Kultur	Kontroll-Kultur	Allergen bzw. Zellen	Konz. final	Konz. Stock	Volumen aus Stock
		natives Phl p 1	10 µg/ml	100 µg/ml	20µl
		Phl p 1-spez. T-Zellklon	1x10 <sup>5</sup> Zellen	1x10 <sup>6</sup> Zellen	100µl
		DZ	1x10 <sup>3</sup> Zellen	1x10 <sup>4</sup> Zellen	50µl
		Keratinozyten	1x10 <sup>4</sup> Zellen	2x10 <sup>5</sup> Zellen	50µl

Tabelle 3: Kontroll- bzw. Ko-Kultur Ansatz für das *in vitro* Modell des atopischen Ekzems

### 3.3.5.4 Keratinozyten für die Ko-Kultur

Keratinozyten für die Ko-Kultur wurden als KP1 aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff aufgetaut, expandiert und befanden sich somit in KP2. Ko-Kultur Experimente wurden bei den Probanden 1Ni, 2Ni, 3Ni und 5Ni mit KP2- beim Probanden 4Ni mit KP3 Keratinozyten durchgeführt.

Keratinozyten, die in Ko-Kultur Experimente eingesetzt werden sollten, wurden mit einer Dichte von 80 000 Zellen pro Vertiefung einer 6-kämmerigen MTP in Keratinozytenmedium (+ Hydrocortison) ausgesät. Am Tag 1 nach Aussaat fand ein Mediumwechsel zur Entfernung von Zellfragmenten und toten Zellen statt. Am Tag fünf wurden die bis zu 70-80 %iger Konfluenz bewachsenen Platten zur Hälfte mit 500 U/ml IFN-γ für 6 Stunden in Keratinozytenmedium (-Hydrocortison) stimuliert oder zur anderen Hälfte unstimuliert belassen. Um einen Effekt von IFN-γ in der Ko-Kultur auszuschließen, wurde das Zytokin durch mehrmaliges waschen mit DPBS w/o aus der Kultur entfernt. Die Keratinozyten wurden für weitere 24 Stunden in 2 ml Keratinozytenmedium Hydrocortison inkubiert.

Am Tag der Ko-Kultur wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst, gezählt und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in Proliferationsmedium eingestellt. Final wurden in die Ko-Kultur  $1 \times 10^4$  Keratinozyten eingesetzt (entspricht  $50 \mu\text{l}$ ) (Tabelle 2 und 3).

### *Differenzierung von Keratinozyten*

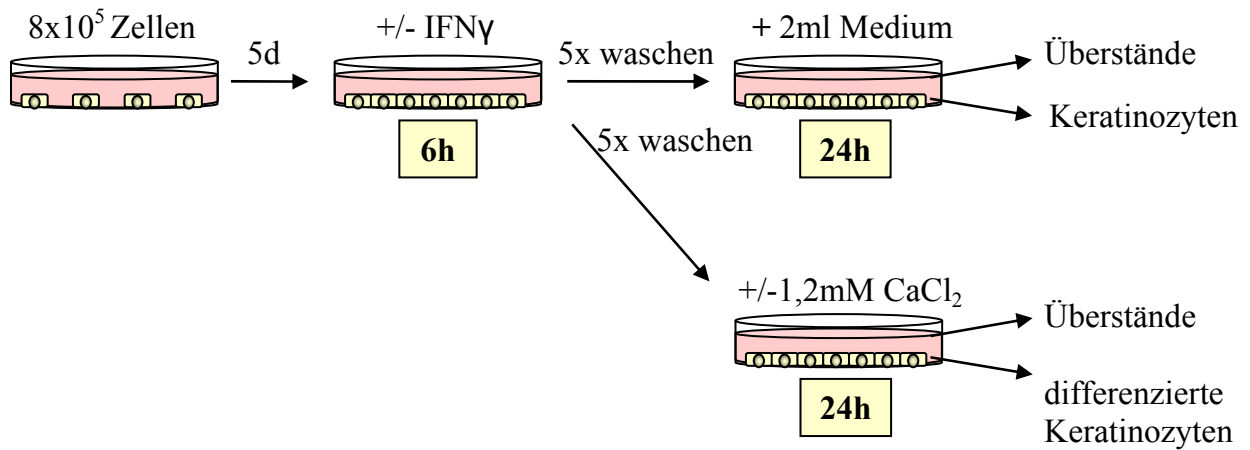
Keratinozyten wurden zunächst für 6 Stunden mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen und anschließend durch Zusatz von 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$  ins Medium für 24 Stunden zur Differenzierung angeregt. Differenzierte Keratinozyten wurden in der gleichen Konzentration ( $1 \times 10^4$  Zellen) in die Ko-Kultur eingesetzt, wie nicht-differenzierte Keratinozyten.

### *PFA Fixierung von Keratinozyten*

In einem Teil der Experimente wurden Keratinozyten am Tag der Ko-Kultur mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Hierzu wurden die Keratinozyten von der Platte gelöst und mit 2% PFA in DPBS w/o 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde das fixierende PFA durch dreimaliges Waschen mit DPBS w/o entfernt und die fixierten Keratinozyten in der gleichen Konzentration ( $1 \times 10^4$  Zellen) in die Ko-Kultur eingesetzt, wie nicht-fixierte Keratinozyten.

### *Überstände von Keratinozytenkulturen*

Um die Notwendigkeit von Zell-Zell Kontakten während der Ko-Kultur untersuchen zu können wurde in einen Teil der Experimente anstelle der Keratinozytenzellen nur der Überstand der Keratinozytenkultur eingesetzt. Dieser wurde am Tag der Ko-Kultur vor dem Ablösen der Keratinozyten asserviert und in gleichem Volumen ( $50 \mu\text{l}$ ) in die Ko-Kultur eingesetzt (Abb. 10).



**Abb. 10: Generierung von differenzierten Keratinozyten und zellfreien Keratinozyten Überständen**

Keratinozyten wurden in einer Konzentration von  $8 \times 10^5$  Zellen in eine 6-kämmerige MTP ausgesät und an Tag fünf mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  für 6 Stunden stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach ausgiebigem Waschen wurde entweder frisches Keratinozytenmedium ohne Hydrocortison oder zur Differenzierung der Zellen Medium mit 1,2 mM CaCl $_2$  zugesetzt und weitere 24 Stunden bis zum Einsatz in der Ko-Kultur inkubiert.

### 3.3.5.5 Auswertung der Kontroll- bzw. Ko-Kultur

Um die Änderung der T-zellulären Proliferation und Zytokinproduktion in Reaktion auf Keratinozyten bestimmen zu können, wurde wie folgt die prozentuale Änderung (p) dieser Parameter bestimmt.

*Für die Proliferation:*

$$p = \frac{\text{Spezifische Proliferation des T-Zellklones in der Ko-Kultur (cpm)}}{\text{Spezifische Proliferation des T-Zellklones in der Kontroll-Kultur (cpm)}} \times 100$$

*Für die Zytokinproduktion:*

$$p = \frac{\text{Zytokinproduktion des T-Zellklones in der Ko-Kultur (pg/ml)}}{\text{Zytokinproduktion des T-Zellklones in der Kontroll-Kultur (pg/ml)}} \times 100$$

## 4. Ergebnisse

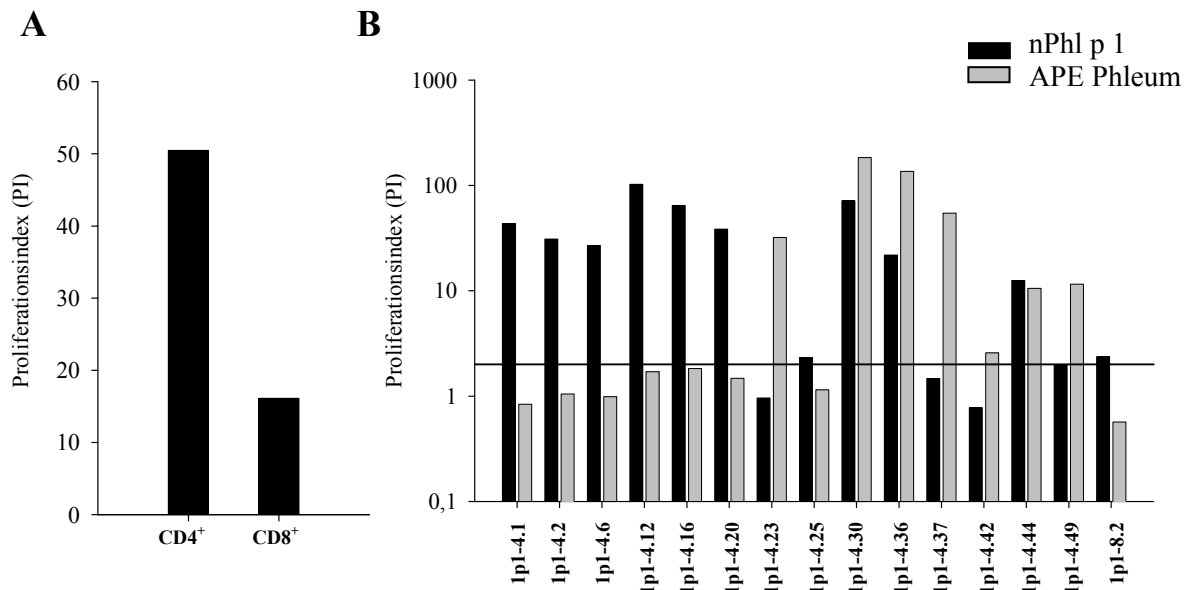
### 4.1 Etablierung eines *in vitro* Ekzem Modells

#### 4.1.1 Isolierung und Charakterisierung der T-Zellklone

Im Rahmen dieser Arbeit konnten acht Phl p 1-spezifische T-Zellklone von zwei Phl p 1-sensibilisierten Spendern und 32 Nickel-spezifische T-Zellklone von fünf Nickel-Allergikern isoliert werden.

##### 4.1.1.1 Isolierung und Charakterisierung von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen

Die Etablierung der Isolierung Phl p 1-spezifischer T-Zellklone wird exemplarisch für den Probanden 1p1 dargestellt. Die T-Zell Linie, die zur Anreicherung Allergen-spezifischer T-Zellen angelegt wurde, zeigte für die CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Proliferationsindex (PI) von 50,5 zw. 16,1 auf natives Phl p 1 (Abb. 12, A; Tab. 4). Durch die im Anschluss durchgeführte Klonierung konnten 53 CD4<sup>+</sup> und 6 CD8<sup>+</sup> T-Zellklone generiert werden. Der Spezifitätstest dieser Klone wurde sowohl mit nativem Phl p 1 als auch wässrigem Pollenextrakt (APE Phleum), der aus Phleum pratense Pollen hergestellt wurde, durchgeführt (Abb. 12, B). Zwölf CD4<sup>+</sup> und ein CD8<sup>+</sup> T-Zellklon zeigten einen spezifischen PI größer 2 auf natives Phl p 1. Die Proliferationsergebnisse mit APE Phleum entsprachen nicht den Ergebnissen mit nativem Allergen; nur drei Klone zeigten ähnliche Indices, acht Klone proliferierten nicht spezifisch auf APE Phleum wohingegen drei Klone eine stärkere Proliferation zeigten. Da die Linie mit nativem Phl p 1 angesetzt wurde und nicht auszuschließen ist, dass Substanzen in APE enthalten sind, die die Proliferation unspezifischerweise beeinflussen, wurden ausschließlich Klone mit einer spezifischen Proliferation auf natives Allergen expandiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Nach erneutem Auftauen blieb die Spezifität nur bei sieben CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen erhalten.



**Abb. 11: Proliferation der Linie des Probanden 1p1 und Spezifitätstest der isolierten Klone**

(A) Proliferationsindex der Linie des Probanden 1p1 auf natives Phl p 1 (B) Spezifitätstest der isolierten T-Zellklone des Probanden 1p1 auf natives Phl p 1 (schwarze Balken) und wässrigen Pollenextrakt (APE) von *Phleum pratense* Pollen (graue Balken). Die Linie gibt den Proliferationsindex von 2 wieder, der als spezifische Proliferation gewertet wurde.

Die Linie des zweiten Phleum-sensibilisierten Probanden, 2p1, zeigte einen PI auf natives Phl p 1 von 3,1 bei CD4<sup>+</sup> und 7,3 bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 4). Insgesamt konnten durch Klonierung 21 CD4<sup>+</sup> und 32 CD8<sup>+</sup> T-Zellklone generiert werden. Drei CD4<sup>+</sup> T-Zellklone zeigten einen spezifischen Proliferationsindex auf natives Phl p 1, die jedoch nur bei einem Klon nach erneutem Auftauen erhalten blieb (Daten nicht gezeigt).

Proband	CD4/ CD8	PI Linie	Anzahl Klone	Anzahl spez. Klone	PI Klone	dauerhaft spez. Klone
1p1	CD4 <sup>+</sup>	50,5	53	12	41,5 ± 9,1	7
	CD8 <sup>+</sup>	16,1	6	1	2,4	-
2p1	CD4 <sup>+</sup>	3,1	21	3	5,5 ± 1,5	1
	CD8 <sup>+</sup>	7,3	32	-	-	-

**Tabelle 4: Zusammenfassung der etablierten Phl p 1-spezifischen T-Zellklone**

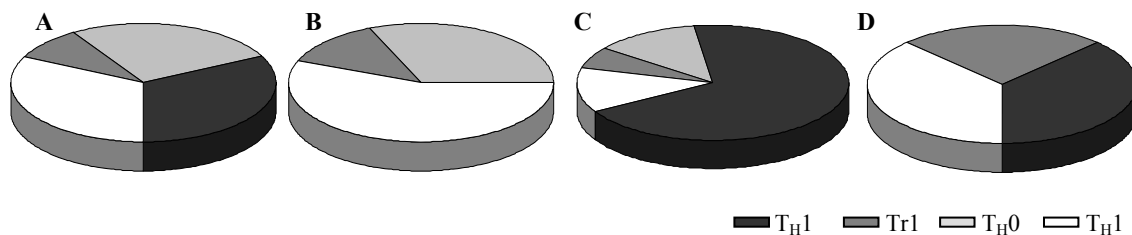
Zur weiteren Charakterisierung der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8 durchflusszytometrisch bestimmt. Alle Klone zeigten, entsprechend ihrer Isolierung anhand antiCD4 „microbeads“, die Expression des CD4 Oberflächenmoleküls.

Das Zytokinprofil der T-Zellklone wurde, wie unter 3.3.2.1 beschrieben, charakterisiert. Phl p 1 spezifische T-Zellklone zeigten eine gleiche Verteilung von Typ1 und Typ2 Zellen (jeweils 37,5%) und einen relativ hohen Anteil von Tr1 (25%) (Abb 12. D). T<sub>H</sub>0 Zellen konnten nicht isoliert werden.

#### 4.1.1.2 Charakterisierung der isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklone

Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker in der Gruppe der Nickel-spezifischen T-Zellklone ergab eine deutliche Dominanz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (90,6%) gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen (9,4%) (Tabelle 4).

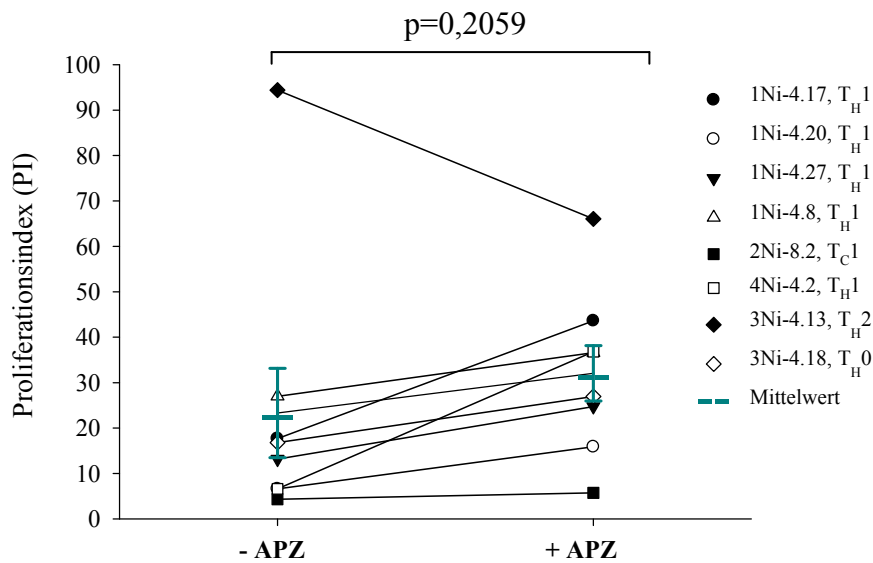
Das Zytokinprofil dieser Klone zeigte eine gleiche Verteilung von Zellen des Typ1- und Typ2- Phänotyps (jeweils 34,4%) und einen Anteil von 21,8% T<sub>H</sub>0 Zellen. Tr stellten mit 9,4% die kleinste Subpopulation von T-Zellen in dieser Gruppe dar (Abb. 12, A). Der hohe Anteil von Typ2 Zellen ist bedingt durch das Verteilungsmuster der T-Zell Subpopulationen bei Proband 5Ni, bei dem keine Typ1 Zellen isoliert werden konnten (Abb. 12, B). Bei den anderen Probanden (1Ni, 2Ni, 3Ni und 4Ni) lag dagegen eine deutliche Dominanz von Typ1 Zellen vor (Abb. 12, C).



**Abb. 12: Verteilung der T-Zell Subtypen innerhalb des Nickel- bzw. Phleum-spezifischen Klonkollektives**  
 (A) Verteilung der T-Zellsubtypen innerhalb des Nickel-spezifischen Klonkollektives (Klone32); (B) Verteilung der T-Zellsubtypen bei Klonen des Probanden 5Ni (Klone 16); (C) Verteilung der T-Zellsubtypen bei Klonen der Probanden 1Ni, 2Ni, 3Ni, 4Ni (Klone 16); (D) Verteilung der T-Zellsubtypen innerhalb des Phl p 1-spezifischen Klonkollektives (Klone 8)

Unter den isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklonen konnten auch solche identifiziert werden, die für die Nickel-spezifische Proliferation nicht auf Präsentation des Allergens durch professionellen APZ angewiesen waren (s. 1.3.2.1). Diese als „Selfpresenter“ bezeichneten Klone wurden erstmals von Nasorri et al. [120] vorbeschrieben.

25% (acht Klone) der in dieser Arbeit isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklone sind „Selfpresenter“. Die Proliferation von sechs „Selfpresentern“ war ohne APZ etwas schwächer, jedoch nicht signifikant schwächer, ausgeprägt (Abb.13). Ein Klon proliferierte stärker als „Selfpresenter“ (4Ni-4.13), ein Klon reagierte in An- und Abwesenheit von APZ identisch (2Ni8.2). Im Mittel ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Proliferation in Ansätzen mit oder ohne APZ ( $p=0,2059$ ). „Selfpresenter“ Klone gehörten hauptsächlich der Typ1 Subpopulation an (75%), die Typ2 und  $T_H0$  Population ist, wie auch von Nasorri et al. berichtet, unterrepräsentiert (jeweils 12,5%). Regulatorische „Selfpresenter“ konnten nicht identifiziert werden.



**Abb. 13: Vergleich des PI von „Selfpresenter“ Klonen in An- und Abwesenheit von APZ**

Nickel-spezifische „Selfpresenter“ Klone wurden sowohl in An- als auch Abwesenheit von APZ mit Nickel inkubiert. Aufgetragen ist der Proliferationsindex beider Ansätze.

Eine Selbst-Präsentation von Aeroallergene oder Allergenen aus Nahrungsmitteln ist in der Literatur nicht beschrieben und konnte auch in unserem Phl p 1-spezifischen Klonkollektiv nicht identifiziert werden. Jedoch ist das Kollektiv aus acht Klonen zu klein, um verlässliche Aussagen treffen zu können.



ERGEBNISSE

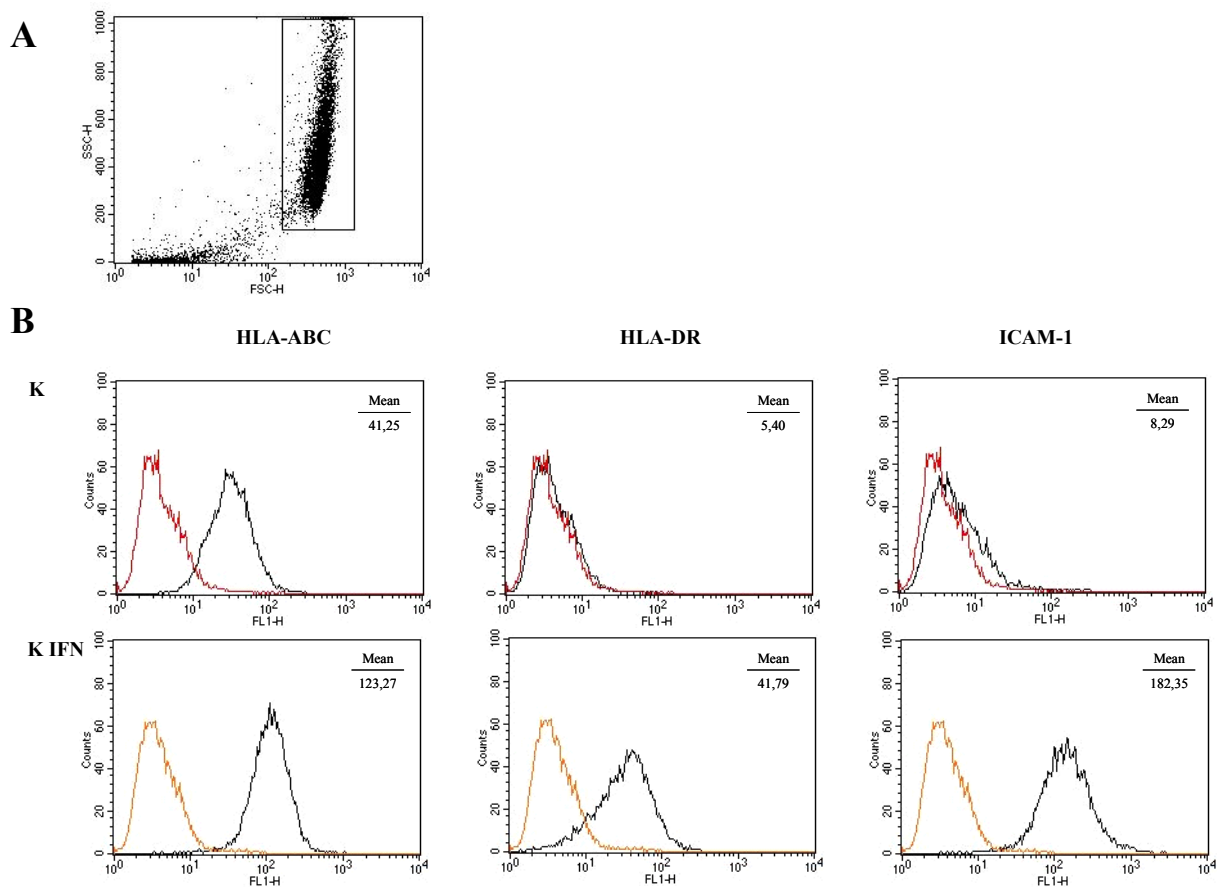
In Tabelle 4 findet sich eine Auflistung und Charakterisierung aller isolierten Phl p 1- und Nickel-spezifischen T-Zellklone.

Klon	CD4/CD8	Subtyp	Besonderheit	Spezifität
1p1-4.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		nPhl p 1
1p1-4.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		nPhl p 1
1p1-4.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		nPhl p 1
1p1-4.12	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		nPhl p 1
1p1-4.36	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		nPhl p 1
2p1-4.5	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		nPhl p 1
1p1-4.16	CD4 <sup>+</sup>	Tr1		nPhl p 1
1p1-4.30	CD4 <sup>+</sup>	Tr1		nPhl p 1
1Ni-4.16	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0	„Selfpresenter“	NiSO <sub>4</sub>
3Ni-4.18	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.3	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.22	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.63	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.65	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.11	CD8 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 0		NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1	„Selfpresenter“	NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.2	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.8	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.17	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.20	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
1Ni-4.27	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
2Ni-8.2	CD8 <sup>+</sup>	T <sub>C</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
4Ni-4.2	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
4Ni-4.10	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
4Ni-4.106	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1		NiSO <sub>4</sub>
3Ni-4.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 1	NiSO <sub>4</sub>	
4Ni-4.38	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2	„Selfpresenter“	NiSO <sub>4</sub>
3Ni-4.13	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.10	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.16	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.20	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.1	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.7	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.8	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.9	CD8 <sup>+</sup>	T <sub>C</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.10	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.50	CD4 <sup>+</sup>	T <sub>H</sub> 2		NiSO <sub>4</sub>
3Ni-4.21	CD4 <sup>+</sup>	Tr1		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-4.17	CD4 <sup>+</sup>	Tr1		NiSO <sub>4</sub>
5Ni-8.52	CD4 <sup>+</sup>	Tr1		NiSO <sub>4</sub>

Tabelle 4: Charakterisierung der isolierten Nickel- und Phl p 1-spezifischen T-Zellklone

#### 4.1.2 Aktivierung humaner Keratinozyten mit IFN- $\gamma$

Um eine bestehende Entzündungsreaktion *in vitro* zu imitieren, wurde ein Teil der Keratinozyten im Vorfeld des Ko-Kultur Experimentes mit IFN- $\gamma$  vorstimuliert (inflammatorische Keratinozyten). Die Aktivierung der Keratinozyten wurde anhand der Oberflächenmarker HLA-ABC, HLA-DR, und ICAM-1 durchflusszytometrisch kontrolliert (Abb. 14).



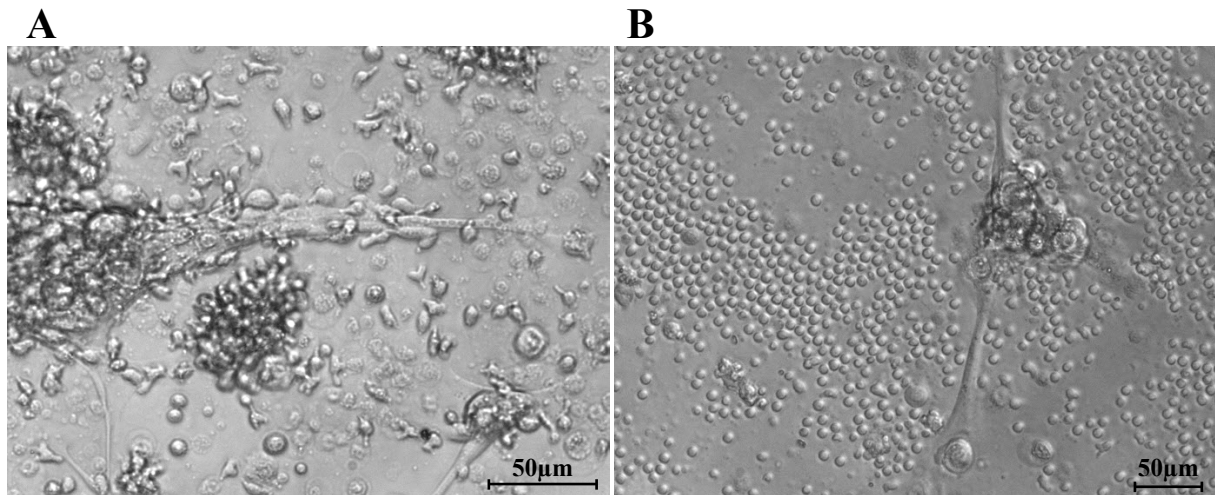
**Abb. 14: Aktivierung humaner Keratinozyten mit IFN- $\gamma$**

Keratinozyten wurden mit IFN- $\gamma$  (500 U/ml) für sechs Stunden stimuliert und nach weiteren 24 Stunden Kultur die Expression der Oberflächenmarker HLA-ABC, HLA-DR und ICAM-1 durchflusszytometrisch gemessen. In (A) ist der sog. „forward/sideward scatter“ gezeigt, über den Keratinozyten anhand ihrer Größe und Granularität bestimmt werden können. (B) vergleicht die Expression der Oberflächenmoleküle bei nicht-stimulierten (K) und IFN- $\gamma$ -vorstimulierten (K IFN) Keratinozyten (schwarze Linie) im Vergleich zur Isotyp Kontrolle (rote Linie für K, orange Linie für K IFN). Die Stärke der Expression des einzelnen Moleküls wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität („Mean“) wiedergegeben.

Keratinocyten exprimieren konstitutiv das MHC-Klasse-I Molekül HLA-ABC, diese Expression wird durch IFN- $\gamma$  weiter gesteigert. IFN- $\gamma$  bewirkt zudem eine Expression des MHC-Klasse-II Moleküls HLA-DR und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Abb. 14).

## 4.2 Interaktionen von Keratinocyten und T-Zellen

In der Ekzemreaktion *in vivo* wurde morphologisch eine enge räumliche Interaktion von einwandernden T-Zellen und Keratinocyten nachgewiesen [54]. Eine solche Interaktion wurde auch in dem in dieser Arbeit beschriebenen Zellkultursystem (s. 3.3.5) lichtmikroskopisch näher untersucht (Abb. 15). Durch die Zugabe von Nickel zur Ko-Kultur von Keratinocyten und T-Zellklonen kam es in Anwesenheit von APZ zur Aktivierung der T-Zellen, die sich in einer birnenförmigen Zellform und in einer engen Interaktion von T-Zellen mit Keratinocyten äußerte (Abb. 15, A). Die Ausläufer und der Zellkörper des Keratinocyten in Abb. 13, A sind dicht besetzt mit aktivierten T-Zellen, wohingegen ohne Zugabe des Allergens Nickel sowohl die Aktivierung der T-Zellen, als auch deren Interaktion mit Keratinocyten ausbleibt (Abb. 15, B).

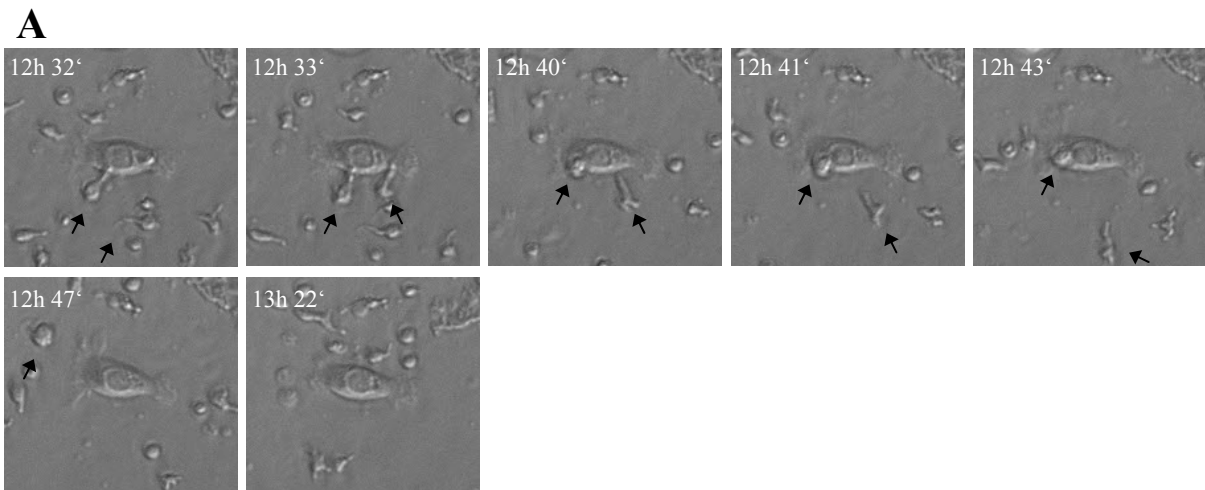


**Abb. 15: Interaktion von Keratinocyten und T-Zellen**

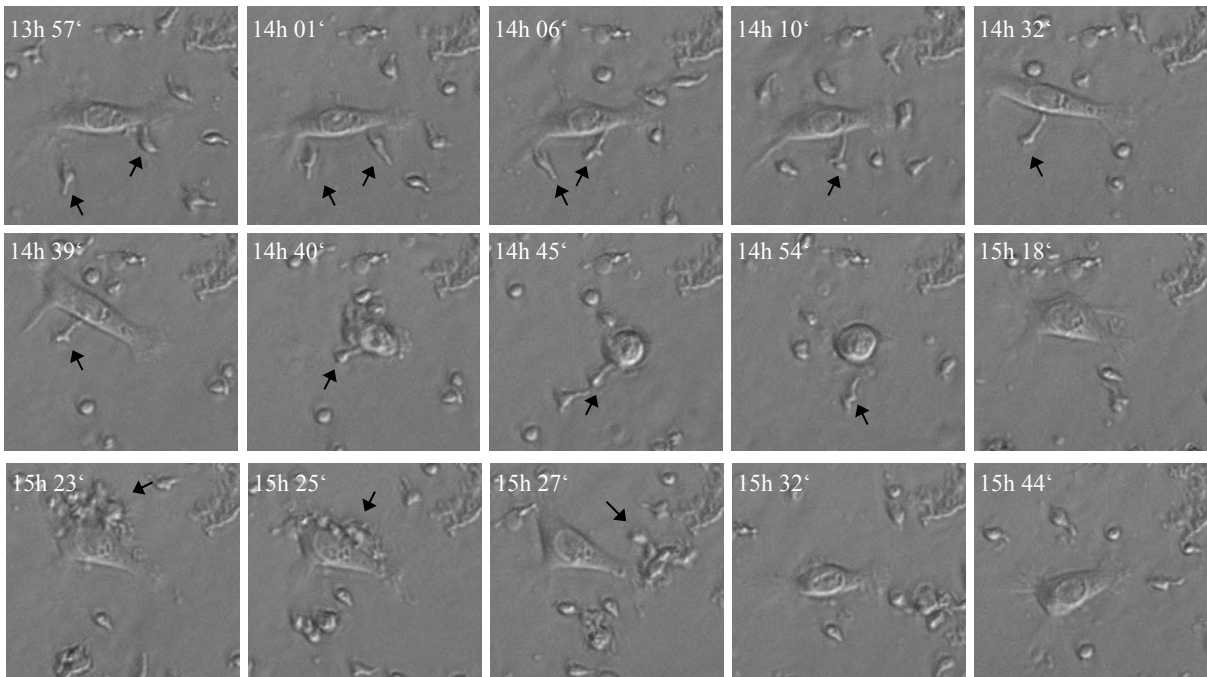
Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Ko-Kultur Ansatz autologer Keratinocyten, Nickel-spezifischer T-Zellen und DZ in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) des Allergens Nickel. (Vergrößerung (A): 1:32; (B) 1:20)

Die gezeigten Interaktionen von Keratinozyten und T-Zellen innerhalb der Ko-Kultur konnten zudem über einen Zeitverlauf von vier Stunden lichtmikroskopisch verfolgt werden (Abb. 16). Begonnen wurde mit der Aufzeichnung 12 Stunden nach Beginn der Ko-Kultur. Gezeigt sind Interaktionen des Nickel-spezifischen Klonen 5Ni-4.10 mit autologen, unstimulierten Keratinozyten.

32 Minuten nach Beginn der Aufzeichnung trat im Gesichtsfeld eine T-Zelle in Kontakt mit dem beobachteten Keratinozyten, eine Minute später eine weitere T-Zelle, deren Kontakt jeweils 12 bzw. sieben Minuten dauerten (Abb. 16, A). Etwa eine Stunde später kam es wieder zur Interaktion zweier T-Zellen und dem Keratinozyten. Während der Kontakt der einen T-Zelle nur neun Minuten dauerte, endete die Wechselwirkung der zweiten T-Zelle erst nach 57 Minuten mit einer Abkuglung und Formveränderung des Keratinozyten, von der er sich 24 Minuten nach Beendigung des Kontaktes wieder erholt hatte. Die Kernstruktur des Keratinozyten jedoch erschien zunehmend granulär (Abb. 16, B). Wenige Minuten später kam es zu einem nur kurz andauernden Kontakt mit mehreren T-Zellen, der für den Keratinozyten phänotypisch ohne Folge blieb. Nach 15 Stunden und 49 Minuten induzierte wiederum eine T-Zelle durch kurzen Kontakt an einem Ausläufer des Keratinozyten eine ebenfalls reversible Formveränderung (Abb. 16, C). Interaktionen zwischen Keratinozyten und DZ konnten nicht beobachtet werden (Abb. 16, D).



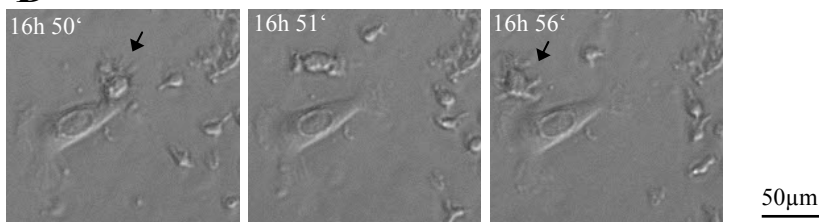
**B**



**C**



**D**



**Abb. 16: Interaktionen von einem Keratinozyten und T-Zellen im Zeitverlauf**

Die Interaktion eines im Gesichtsfeld liegenden Keratinozyten und des Nickel-spezifischen T-Zellklons 5Ni-4.10 wurden, beginnend 12 Stunden nach Ko-Kultivierung, im Abstand von einer Minute lichtmikroskopisch erfasst (angegebene Zeitpunkte in der Aufnahme). In (A) ist der erste, in (B) der zweite und in (C) der dritte Kontakt des beobachteten Keratinozyten mit T-Zellen in relevanten Ausschnitten des Geschehens dargestellt. (D) zeigt den nicht stattfindenden Kontakt zwischen DZ und Keratinozyt.

### 4.3 Einfluss von Keratinozyten auf die Proliferation von Allergen-spezifischen T-Zellen

Die Wechselwirkungen von T-Zellen und Keratinozyten während der Ekzemreaktion wurden in einem autologen Ko-Kultursystem untersucht. Diese Ko-Kultur setzt sich zusammen aus einem Allergen-spezifischen T-Zellklon, APZ, Allergen und autologen Keratinozyten. Die spezifische Proliferation (bzw. Zytokinproduktion (4.4)) des T-Zellklones innerhalb der Ko-Kultur wird prozentual bezogen auf die Kontroll-Kultur, die sich ausschließlich aus T-Zellklon, APZ und Allergen zusammensetzt. So errechnet sich eine prozentuale Änderung der Proliferation bzw. der Zytokinproduktion in Anwesenheit von Keratinozyten.

In Ko-Kultur Experimente wurden ausschließlich T-Zellklone eingesetzt, die einen spezifischen Proliferationsindex (PI) größer 2 aufwiesen (s. 3.3.5.5) und somit spezifisch auf das Allergen reagierten.

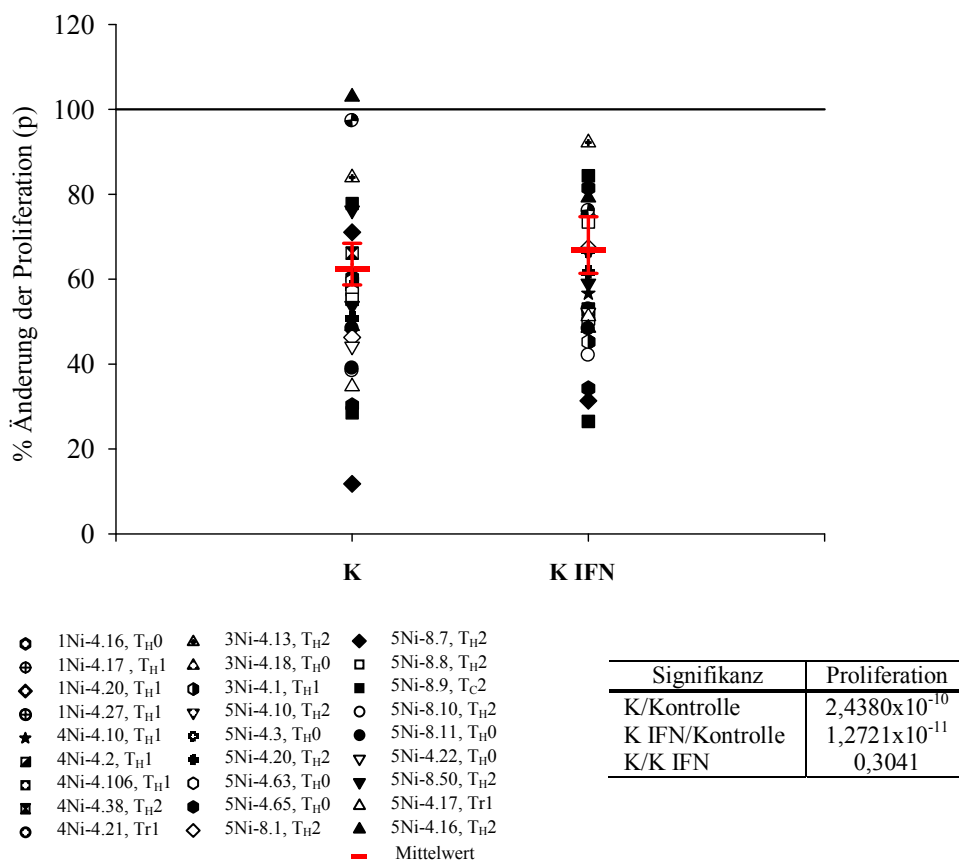
#### 4.3.1 Keratinozyten modulieren die Proliferation von Nickel-spezifischen T-Zellen im *in vitro* Modell der allergischen Kontaktdermatitis

##### 4.3.1.1 Autologe Keratinozyten hemmen die Proliferation in der Mehrheit der untersuchten Nickel-spezifischen T-Zellklone

84% der isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklone zeigten in insgesamt 88 Ko-Kultur Experimenten in Anwesenheit von autologen Keratinozyten eine reproduzierbare, hoch signifikante Hemmung ihrer spezifischen Proliferation auf Nickel (Abb. 17). Diese Hemmung war sowohl für Ko-Kultur Ansätze mit ruhenden, unstimulierten Keratinozyten ( $p=2,438 \times 10^{-10}$ ) als auch für Ansätze mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten, inflammatorischen Keratinozyten ( $p=1,272 \times 10^{-11}$ ) signifikant. Ein signifikanter Unterschied zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten konnte nicht ermittelt werden ( $p=0,3041$ ).

Klone, deren Proliferation durch autologe Keratinozyten gehemmt wurde, werden im Weiteren als Proliferations-gehemmte Klone bezeichnet.

In der Gruppe der Proliferations-gehemmten Klone fanden sich T-Zellklone aus allen T-Zell Subtypen (T<sub>H</sub>0, Typ1, Typ2 und Tr1) (s. Tabelle 4).

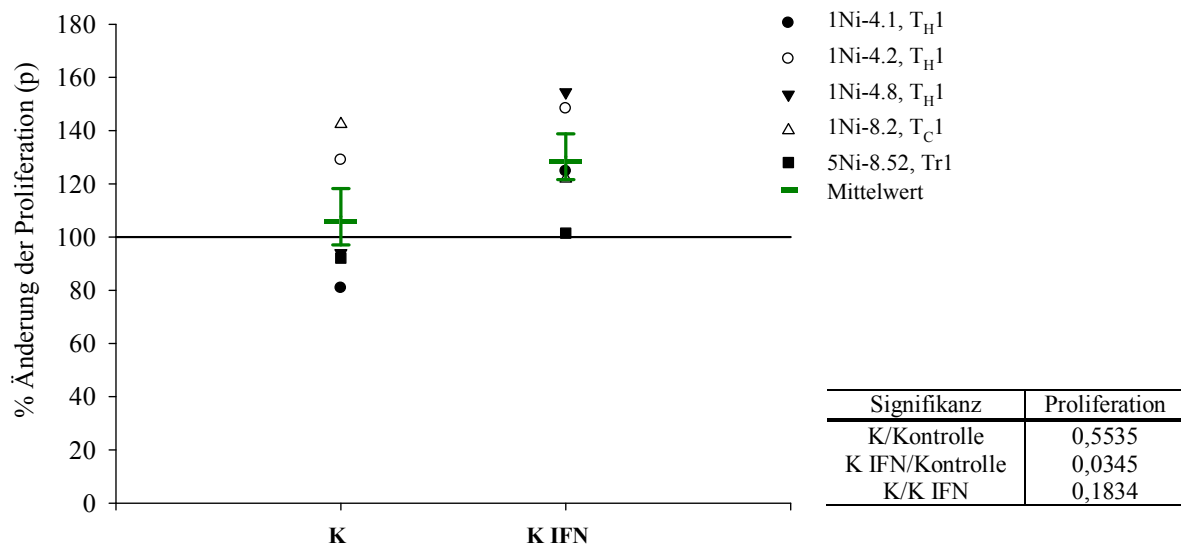


**Abb. 17: Keratinozyten hemmen die Proliferation von 84% der Nickel-spezifischen T-Zellklone**

Die schwarze Linie repräsentiert die spezifische Proliferation der T-Zellklone innerhalb der Kontroll-Kultur, die gleich 100% gesetzt wurde. Von jedem T-Zellklon (Datenpunkt) wurden mindestens drei Ko-Kultur Experimente mit autologen Keratinozyten durchgeführt. Der Datenpunkt gibt den Mittelwert dieser Experimente und die prozentuale Änderung der Proliferation im Vergleich zur Kontroll-Kultur wieder. Der Mittelwertsbalken und dessen Standardabweichung („standard error of the mean“, SEM) berechnen sich aus der Summe aller Experimente. In der Tabelle sind die Signifikanzen der Ko-Kultur Experimente bezogen auf die Kontroll-Kultur angegeben. K bezeichnet die Ko-Kultur mit ruhenden Keratinozyten, K IFN diejenige mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten, inflammatorischen Keratinozyten. Der Wert K/K IFN gibt den Unterschied zwischen Ansätzen mit ruhenden bzw. inflammatorischen Keratinozyten wieder. (n=88, Klone 27)

4.3.1.2 Autologe Keratinozyten induzieren die Proliferation in einer Minderheit der untersuchten Nickel-spezifischen T-Zellklone

16% der Nickel-spezifischen Klone hingegen wurden durch Keratinozyten zu einer verstärkten spezifischen Proliferation im Vergleich zur Kontroll-Kultur angeregt (Abb. 18). Klone, deren Proliferation durch autologe Keratinozyten verstärkt wird, werden im Weiteren als Proliferations-induzierte Klone bezeichnet. Die Induktion der Proliferation war für inflammatorische Keratinozyten signifikant ( $p=0,0345$ ), für ruhende Keratinozyten hingegen nicht ( $p=0,5535$ ); dies kann zum einen an der geringen Fallzahl ( $n=17$ ) liegen und zum anderen an Klon 5Ni-8.52, der in seiner Proliferation nicht beeinflusst wird, und Klon 1Ni-4.1, der durch ruhende Keratinozyten in seiner Proliferation leicht gehemmt wird.



**Abb. 18: Keratinozyten induzieren die Proliferation in einer Subgruppe von Nickel-spezifischen T-Zellklonen**

In die Ko-Kultur wurden sowohl ruhende (K) als auch inflammatorische (K IFN) Keratinozyten eingesetzt. Angegeben ist die prozentuale Hemmung der T-Zellproliferation (p) innerhalb der Ko-Kultur im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%). Die Tabelle gibt die Signifikanz der Experimente mit K oder K IFN und den Unterschied zwischen beiden wieder (K/KIFN). ( $n=17$ , Klone 5)



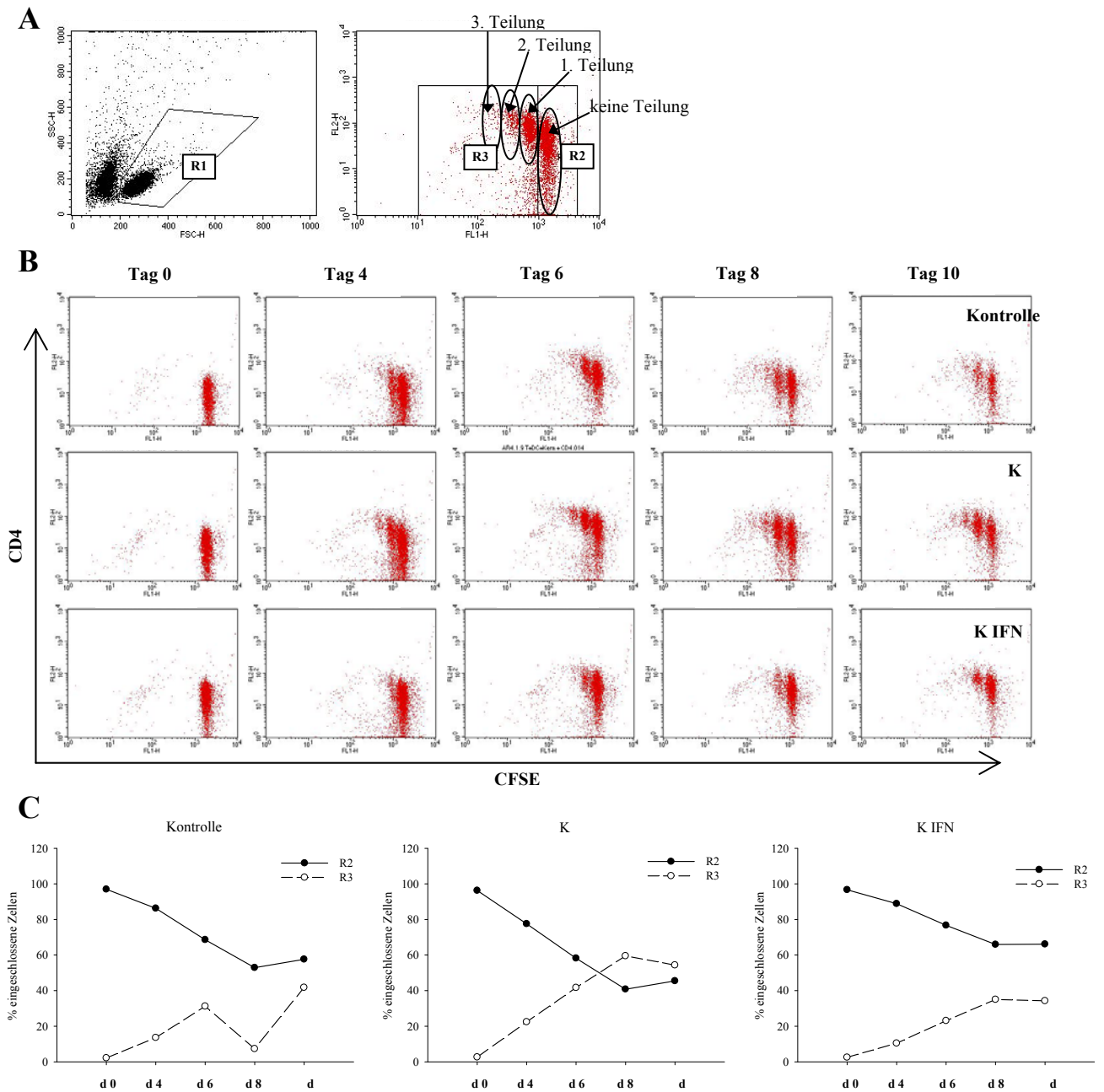
Ein signifikanter Unterschied zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten im Einfluss auf die T-Zellproliferation konnte auch in der Gruppe der induzierten Klone nicht ermittelt werden ( $p=0,18$ ).

Die Gruppe der Proliferations-induzierten Klone ist gekennzeichnet durch eine Dominanz von  $T_{H1}$  Klonen (vier von fünf Klonen). Ein Klon (5Ni-4.52) zeigte einen  $Tr1$  Phänotyp.  $T_{H2}$  Klone wurden in ihrer Proliferation nicht induziert.

### 4.3.1.3 Nachweis der Proliferations-Induktion mittels CFSE Färbung

Die Induktion der Proliferation konnte zusätzlich durchflusszytometrisch mit der Methode der CFSE Färbung gezeigt werden. Über den sog. „forward/sideward scatter“ werden unmarkierte T-Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität bestimmt („Gate“ R1) (Abb. 19, A). Die Auswertung der nachfolgenden CFSE Färbung bezieht sich ausschließlich auf die im „Gate“ R1 liegende T-Zellen. Das „Gate“ R2 schließt alle CFSE-positiven, nicht oder noch nicht proliferierenden Zellen ein, das „Gate“ R3 alle CFSE-positiven, proliferierenden Zellen (Abb. 17, B).

Die Proliferationsaktivität eines Nickel-spezifischen T-Zellklons wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen innerhalb der Kontroll-Kultur und der Ko-Kultur untersucht. Dieser T-Zellkon wurde durch die Anwesenheit von ruhenden Keratinozyten in seiner Proliferation induziert und durch inflammatorische Keratinozyten nicht beeinflusst (Abb. 19, B). In Abb. 17, C ist die Anzahl der Zellen aus R1, die sich entweder in R2 oder R3 befinden, aufgetragen. In allen Ansätzen ist eine Abnahme der CFSE-positiven, nicht-proliferierenden (R2) und eine Zunahme der CFSE-positiven, proliferierenden Zellen (R3) über die Zeit erkennbar. Die Zahl der proliferierenden Zellen überstieg im Ko-Kultur Ansatz mit ruhenden Keratinozyten den Wert der Kontroll-Kultur (60% versus 40%) - dies stellt eine Induktion der Proliferation dar.

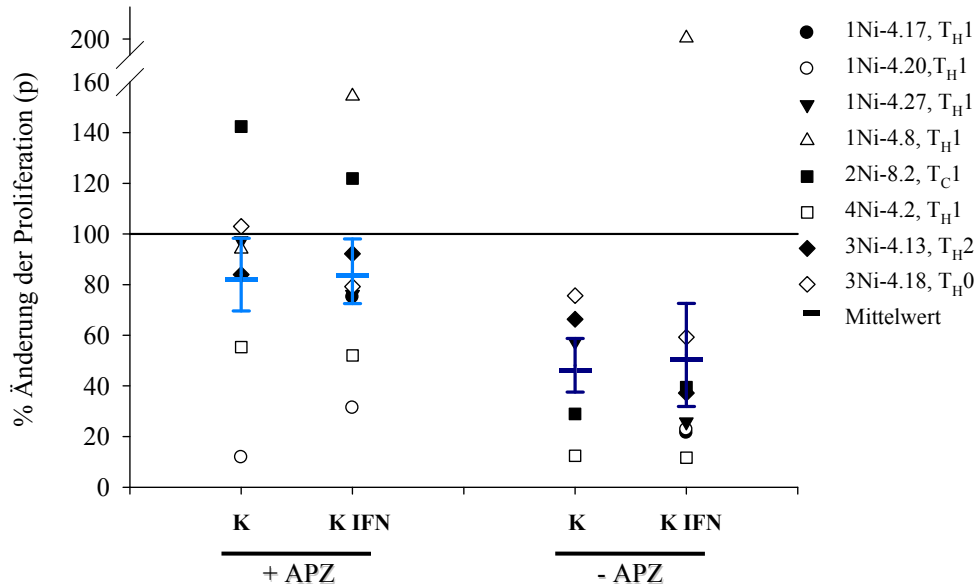


**Abb. 19: Messung der T-Zellproliferation mittels CFSE-Markierung**

Ein Nickel-spezifischer T-Zellklon wurde mit dem Farbstoff CFSE markiert und die Abnahme der Fluoreszenzintensität, die positiv korreliert mit der Proliferation des T-Zellklones, durchflusszytometrisch gemessen. (A) Die linke Abbildung definiert den T-Zellen nach ihrer Größe und Granularität („Gate“ R1), die rechte Abbildung zeigt das „Gate“ R2 der nicht-proliferierenden T-Zellen und das „Gate“ R3 der proliferierenden T-Zellen, zudem sind die 1.-3. Teilung des T-Zellklons gekennzeichnet. (B) Messung der Fluoreszenzabnahme über einen Zeitverlauf von 10 Tagen in der Ko-Kultur mit unstimulierten Keratinozyten (K) und IFN- $\gamma$  vorstimulierten Keratinozyten (K IFN). (C) Aufgetragen sind über den Zeitverlauf T-Zellen die sich entweder in „Gate“ R2 (nicht-proliferierende, CFSE-positive Zellen) oder „Gate“ R3 (proliferierende, CFSE-positive Zellen) befanden.

4.3.1.4 Autologe Keratinozyten modulieren die Proliferation von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ Klonen

Autologe Keratinozyten wirkten auch auf die Proliferation von „Selfpresenter“ Klonen modulierend (Abb. 20). Sechs Klone wurden in der Anwesenheit von Keratinozyten sowohl mit APZ als auch ohne APZ in ihrer spezifischen Proliferation gehemmt.



Signifikanz	Proliferation +APZ	Proliferation -APZ
K/Kontrolle	0,3405	0,0120
K IFN/Kontrolle	0,3160	0,0646
K/K IFN	0,8162	0,1725

**Abb. 20: Keratinozyten hemmen die Proliferation von „Selfpresenter“ Klonen**

„Selfpresenter“ Klone wurden in der Gegenwart von ruhenden (K) und inflammatorischen (K IFN) Keratinozyten in der Anwesenheit von APZ (hellblauer Mittelwertsbalken) oder Abwesenheit von APZ (dunkelblauer Mittelwertsbalken) inkubiert. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Proliferation (p) im Vergleich zur Kontroll-Kultur. Die Tabelle gibt die Signifikanz der einzelnen Ansätze wieder. (n=30, Klone 8)

Die Hemmung war jedoch in der Abwesenheit von APZ stärker ausgeprägt (s. Tabelle in Abb. 20). Unter den „Selfpresenter“ Klonen befanden sich auch zwei Klone (1Ni-4.8 und 2Ni-8.2), die in die Untergruppe der induzierten Klone fallen. 1Ni-4.8 wurde sowohl in Gegenwart, als auch Abwesenheit von APZ in seiner Proliferation induziert (für diesen Klon liegen als „Selfpresenter“ nur Daten mit IFN- $\gamma$ -stimulierten Keratinozyten vor). 2Ni-8.2 hingegen

reagierte in Anwesenheit von APZ mit einer Induktion, jedoch als „Selfpresenter“ mit einer Hemmung der Proliferation. Aufgrund des Vorkommens von gehemmten und induzierten „Selfpresenter“ Klonen war in der Gesamtheit der Experimente die Hemmung der Proliferation durch Keratinozyten in der Anwesenheit von APZ nicht signifikant ( $p=0,3405$  für K und  $p=0,3160$  für K IFN). Interessanterweise waren Keratinozyten in der Abwesenheit von APZ in der Lage, die Proliferation signifikant zu hemmen ( $p=0,0464$  für K bzw.  $p=0,0485$  für K IFN); ein Unterschied zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten fand sich nicht ( $p=0,8162$  +APZ bzw.  $p=0,1725$  -APZ). Die Tatsache, dass Keratinozyten T-Zell Effektorfunktion auch in Abwesenheit von APZ modulieren weist auf einen Effekt hin, der direkt die T-Zelle beeinflusst und nicht über eine veränderte Allergenpräsentation wirkt.

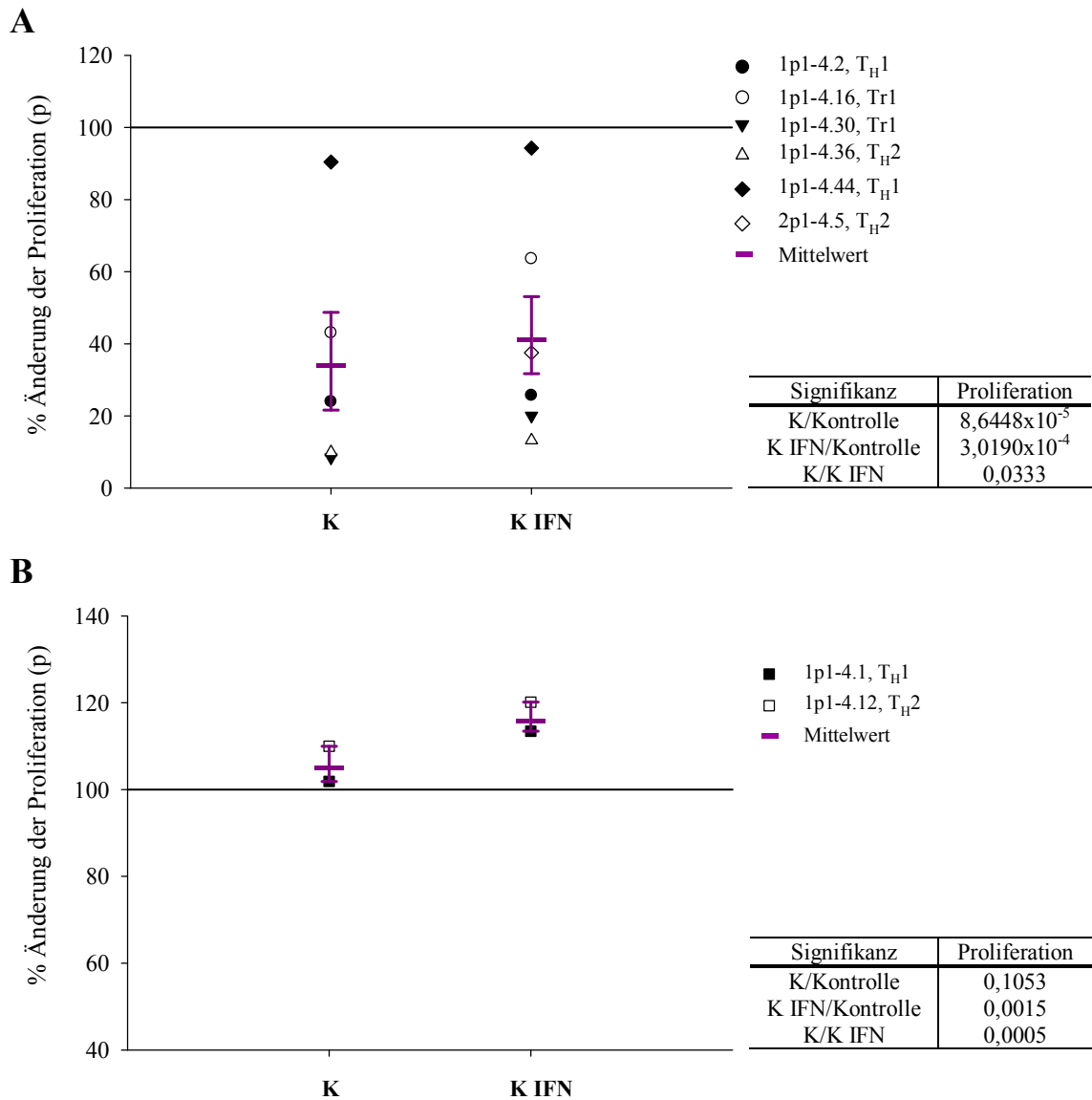
#### 4.3.2 Keratinozyten modulieren die Proliferation von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen im *in vitro* Modell des atopischen Ekzems

Insgesamt acht Phl p 1-spezifische T-Zellklone von zwei *Phleum pratense*-sensibilisierten Probanden konnten isoliert und in Ko-Kultur Experimente eingesetzt werden. Experimente mit diesen Klonen wurden ausschließlich mit DZ als APZ durchgeführt.

Analog zu den Beobachtungen im *in vitro* Modell der allergischen Kontaktdermatitis, wurde auch die Mehrheit (75%, sechs Klone) der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone in ihrer Allergenspezifischen Proliferation durch Keratinozyten signifikant gehemmt (Abb. 21, A). Bei zwei Klonen (25%) fand sich eine Induktion der Proliferation in Gegenwart von Keratinozyten (Abb. 21, B).

Im Gegensatz zu Nickel-spezifischen T-Zellklonen, wurden Phl p 1-spezifische Klone durch ruhende bzw. inflammatorische Keratinozyten unterschiedlich stark beeinflusst. Sowohl die Proliferations-gehemmten als auch die Proliferations-induzierten Phl p 1-spezifischen Klonen wurden durch IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinozyten signifikant stärker beeinflusst (gehemmte Klone  $p=0,0333$ ; induzierte Klone  $p=0,0005$ ). IFN- $\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten hemmten somit die Proliferation weniger stark als unstimulierte Keratinozyten in der Gruppe der gehemmten Klone, induzierten sie jedoch effektiver in der Gruppe der induzierten Klone.

Gehemmte Phl p 1-spezifische T-Zellklone zeigten einen T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- oder Tr1 Phänotyp. Die induzierten Klone 1p1-4.1 und 1p1-4.12 waren vom T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 Subtyp.



**Abb. 21: Keratinozyten modulieren die Proliferation von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen**

Phl p 1- spezifische T-Zellklone wurden mit nativem Phl p 1, DZ und heterologen Keratinozyten inkubiert. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Proliferation (p) in der Ko-Kultur im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%). Die Datentabelle gibt die Signifikanzen wieder. (A) In der Gegenwart von Keratinozyten gehemmte Phl p 1-spezifische T-Zellklone. (n=13, Klone 6); (B) In der Gegenwart von Keratinozyten induzierte Phl p 1-spezifische T-Zellklone. (n=10, Klone 2)

#### 4.4 Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion von T-Effektorzellen

Neben der Proliferation der T-Zellen wurde als zweiter Effektor Parameter die Zytokinproduktion der Klone in Anwesenheit von Keratinozyten untersucht. Hierzu wurden Überstände der Kontroll- und Ko-Kultur vor der  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkubation entnommen und die Konzentration des  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zytokins IFN- $\gamma$ , des  $\text{T}_{\text{H}2}$  Zytokins IL-4 und des regulatorisch wirksamen Zytokins IL-10 im ELISA quantitativ bestimmt. Der Wert p spiegelt die prozentuale Änderung der Zytokinproduktion in Anwesenheit von Keratinozyten im Vergleich zur Kontroll-Kultur wieder und berechnet sich, analog zur der Proliferation, aus dem Quotienten des Ko-Kultur Ansatzes und des Kontroll-Kultur Ansatzes (s. 3.3.5.5)

##### 4.4.1 Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion Nickel-spezifischer T-Zellklone

###### 4.4.1.1 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion Proliferations-gehemmter Nickel-spezifischer T-Zellklone

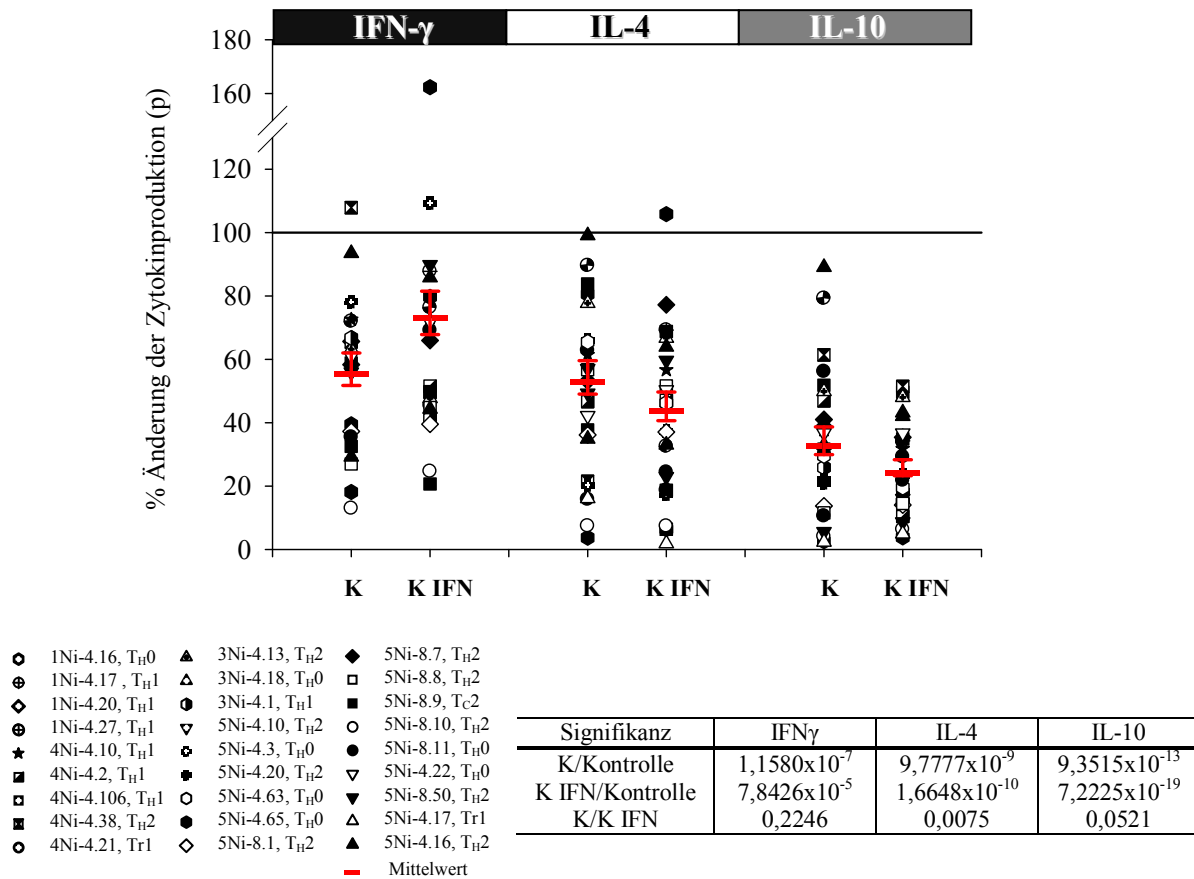
Keratinozyten modulieren neben der Proliferation auch die Zytokinproduktion Proliferations-gehemmter Nickel-spezifischer T-Zellklone.

Die Produktion des  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zytokins IFN- $\gamma$  wurde in 29 von 32 Klonen (90,6%) im Vergleich zur Kontroll-Kultur durch autologe Keratinozyten gehemmt (Abb. 22). Die Hemmung war in Ansätzen mit ruhenden Keratinozyten stärker ausgeprägt ( $p=1,158 \times 10^{-7}$ ) als in solchen mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten Keratinozyten ( $p=7,8426 \times 10^{-5}$ ). In zwei Klonen hingegen wurde IFN- $\gamma$  durch IFN- $\gamma$  Vorstimulation der Keratinozyten induziert. Da die Keratinozyten im Anschluss an die Vorstimulation intensiv gewaschen wurden, kann ein Verschleppen des IFN- $\gamma$  in die Ko-Kultur und somit auch ein Einfluss in der verminderten Hemmung der IFN- $\gamma$  Sekretion durch inflammatorische Keratinozyten ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu IFN- $\gamma$ , wurde die Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10 in allen Nickel-spezifischen Klonen signifikant durch Keratinozyten unterbunden (Abb. 22). IFN- $\gamma$ -vorstimulierte, inflammatorische Keratinozyten hemmten die IL-4 Produktion gegenüber nicht-stimulierten Keratinozyten signifikant stärker ( $p=9,777 \times 10^{-9}$  (K);  $p=1,6648 \times 10^{-10}$

(KIFN);  $p=0,0075$  (K/KIFN)); im Falle der IL-10 Produktion war ein ähnlicher Trend erkennbar ( $p=9,3515 \times 10^{-13}$  (K);  $p=7,2225 \times 10^{-19}$  (KIFN);  $p=0,0521$  (K/KIFN)).

Betrachtet man die prozentuale Hemmung der Zytokinproduktion, so ist IL-10 das Zytokin, das am stärksten durch autologe Keratinozyten beeinflusst wird.



**Abb. 22: Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion Proliferations-gehemmter Nickel-spezifischer T-Zellklone**

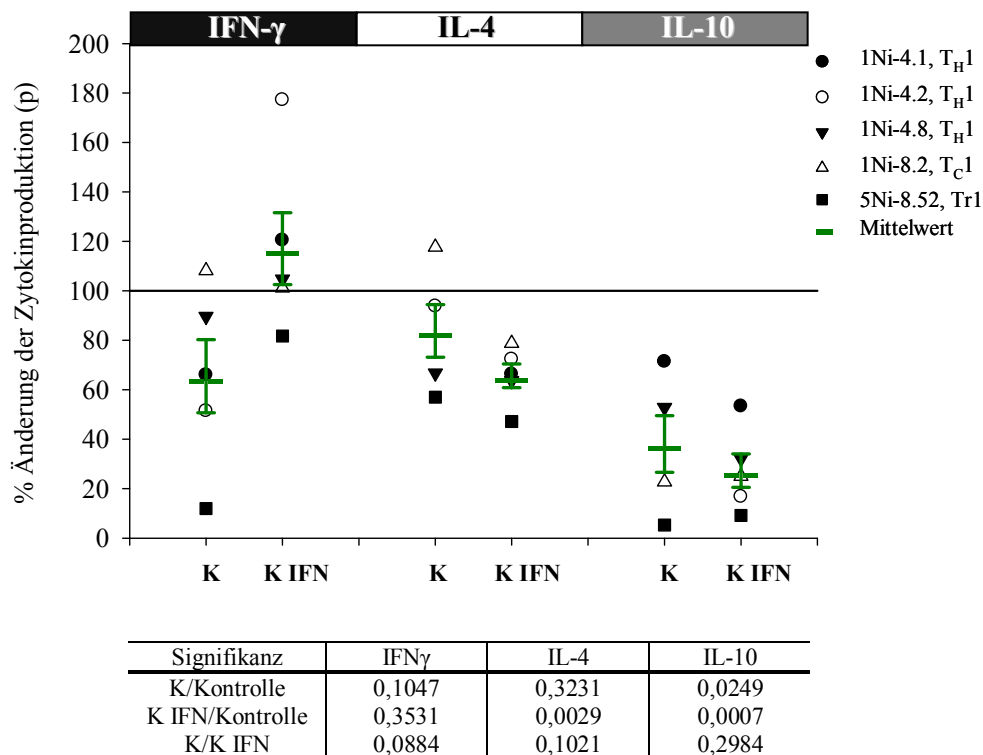
Die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 wurde aus Ko-Kultur Überständen im ELISA bestimmt. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Zytokinproduktion in Anwesenheit von ruhenden (K) oder inflammatorischen (K IFN) Keratinozyten (p) im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%). In der Tabelle sind die Signifikanzen für die einzelnen Zytokine angegeben. (n=88, Klone 27) (IFN- $\gamma$  100% = 10161  $\pm$  1858 pg/ml; IL-4 100% = 2956  $\pm$  508 pg/ml; IL-10 100% = 1326  $\pm$  219 pg/ml)

4.4.1.2 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion Proliferations-induzierter Nickel-spezifischer T-Zellklone

16% der Nickel-spezifischen T-Zellklone zeigten eine erhöhte Proliferation in Anwesenheit von autologen Keratinozyten. Diese Proliferations-induzierten Klone wurden, wie auch die Proliferations-gehemmten Klone, in ihrer Zytokinproduktion beeinflusst (Abb. 23).

Die IFN- $\gamma$  Produktion wurde uneinheitlich reguliert; manche Klone zeigten eine Hemmung, manche eine Induktion. Ruhende Keratinozyten ( $p=0,1047$ ) inhibierten, ähnlich wie bei den Proliferations-gehemmten Klonen, die IFN- $\gamma$  Produktion stärker als inflammatorische Keratinozyten ( $p=0,3531$ ). Dieser Effekt war jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,088$ ).

Die IL-4 Produktion wurde nur im Ko-Kulturansatz mit inflammatorischen Keratinozyten signifikant gehemmt ( $p=0,3231$  (K);  $0,0029$  (KIFN)).



**Abb. 23: Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion Proliferations-induzierter Nickel-spezifischer T-Zellen**

Die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 wurde aus Ko-Kultur Überständen im ELISA bestimmt. Angegeben ist die prozentuale Änderung der Zytokinproduktion in der Anwesenheit von Keratinozyten (p) im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%). In der Tabelle sind die Signifikanzen für die einzelnen Zytokine angegeben. ( $n=17$ , Klone 5) (IFN- $\gamma$  100% =  $15229 \pm 3645$  pg/ml; IL-4 100% =  $788 \pm 232$  pg/ml; IL-10 100% =  $332 \pm 102$  pg/ml)

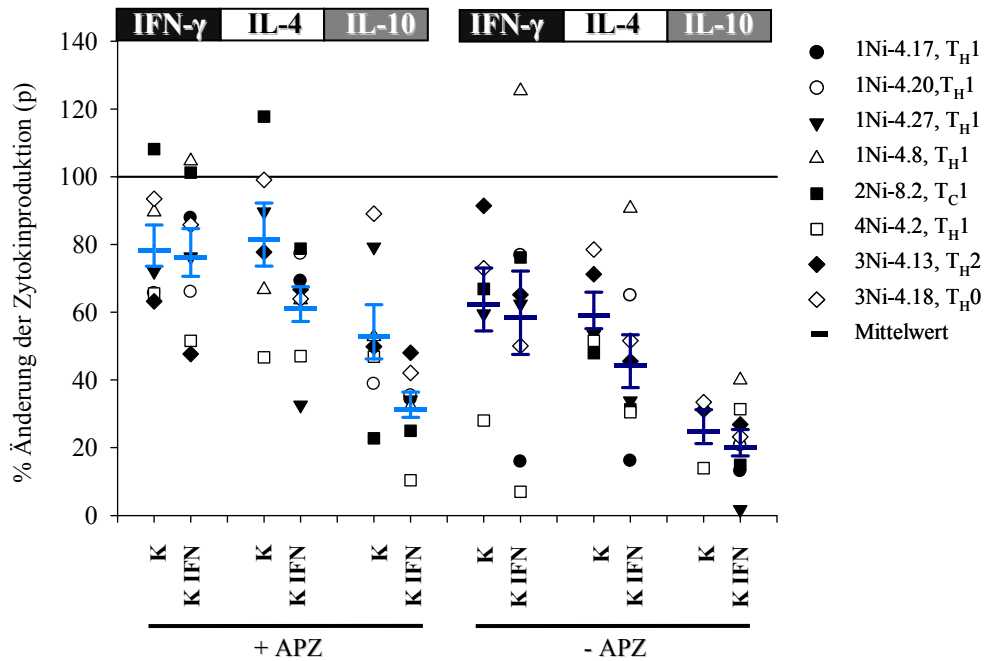


Die Produktion von IL-10 wurde in allen induzierten Klonen signifikant gehemmt ( $p=0,0249$  (K);  $p=0,0007$  (KIFN)). Auch in der Gruppe der induzierten Klone war IL-10 das Zytokin, das am stärksten in seiner Produktion durch autologe Keratinozyten beeinflusst wurde. Unterschiede zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten traten nicht auf (IL-4  $p=0,1021$ ; IL-10  $p=0,2984$ ).

#### 4.4.1.3 Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ Klonen

Da Nickel-spezifische „Selfpresenter“ Klone sowohl in An- als auch Abwesenheit von APZ proliferieren, wurden Ko-Kultur Experimente mit dieser T-Zell Subpopulation unter beiden Bedingungen durchgeführt. Unabhängig von der Art der Allergenpräsentation hemmten Keratinozyten die Zytokinproduktion von „Selfpresenter“ Klonen (Abb. 24). Diese Hemmung war tendentiell in Abwesenheit von APZ stärker ausgeprägt, jedoch nicht signifikant (Signifikanzen nicht gezeigt). IL-10 war analog zu den Ergebnissen der Proliferations-gehemmten und -induzierten Nickel-spezifischen Klone am stärksten moduliert.

Die beiden proliferations-induzierten „Selfpresenter“ Klone, 1Ni-4.8 und 2Ni8.2, reagierten unabhängig von der Proliferation mit einer Hemmung von IL-4 und IL-10. Lediglich bei Klon 1Ni-4.8 wurde IFN- $\gamma$  in der Abwesenheit von APZ induziert.



Signifikanz	IFN $\gamma$ +APZ	IL-4 +APZ	IL-10 +APZ	IFN $\gamma$ -APZ	IL-4 -APZ	IL-10 -APZ
K/Kontrolle	0,0213	0,1551	0,0018	0,0250	0,0028	0,0069
K IFN/Kontrolle	0,0208	0,0002	$6,272 \times 10^{-7}$	0,0186	0,0003	$3,0076 \times 10^{-7}$
K/K IFN	0,4282	0,0450	0,0351	0,1891	0,0003	0,9211

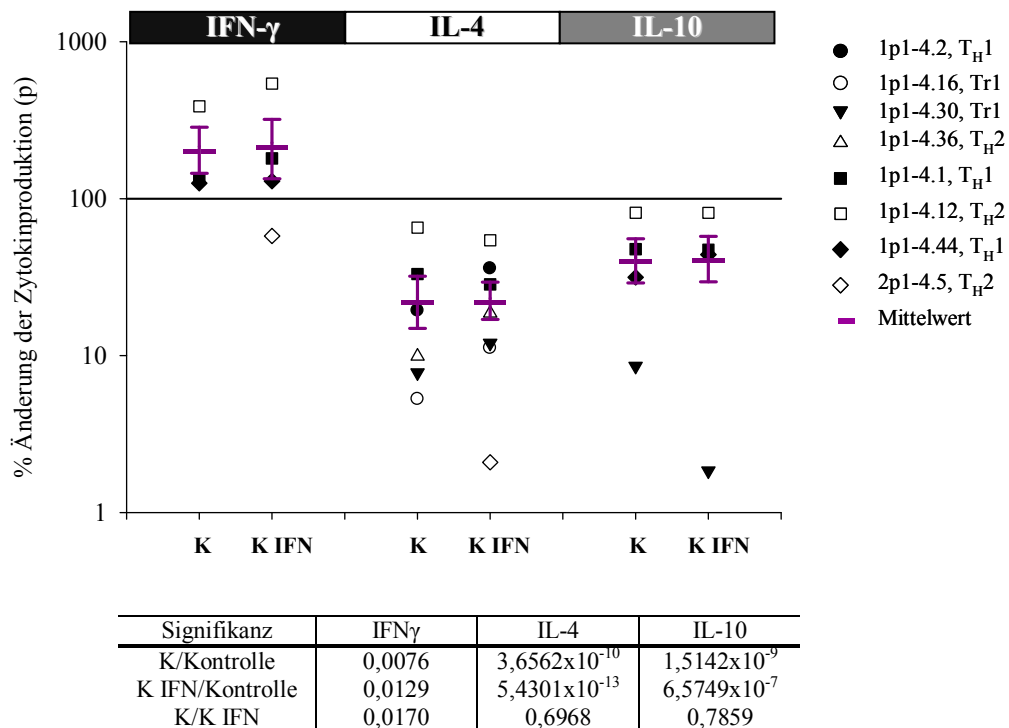
**Abb. 24: Keratinozyten hemmen die Zytokinproduktion von „Selfpresenter“ Klonen**

Überstände der Ko-Kultur von „Selfpresenter“ Klonen mit bzw. ohne APZ und Keratinozyten wurden im ELISA auf die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 untersucht. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Zytokinproduktion im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%) für Ansätze mit APZ (hellblauer Mittelwertsbalken) und Ansätze ohne APZ (dunkelblauer Mittelwertsbalken). Die Tabelle gibt die Signifikanzen für die einzelnen Ansätze mit und ohne APZ an. (n=30, Klon 8) (+APZ: IFN- $\gamma$  100% =  $15218 \pm 2551$  pg/ml; IL-4 100% =  $5328 \pm 1292$  pg/ml; IL-10 100% =  $2795 \pm 542$  pg/ml; -APZ: IFN- $\gamma$  100% =  $8093 \pm 2284$  pg/ml; IL-4 100% =  $3180 \pm 1054$  pg/ml; IL-10 100% =  $825 \pm 303$  pg/ml)

#### 4.4.2 Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion von Phl p 1- spezifischen T-Zellklonen

Phl p 1-spezifische T-Zellklone reagierten in ihrer Mehrheit mit einer Hemmung ihrer Proliferation auf Keratinozyten und zeigen ebenfalls eine Modulation der Zytokinproduktion in der Gegenwart von Keratinozyten.

Ruhende und inflammatorische Keratinozyten induzierten signifikant die Sekretion von IFN- $\gamma$  in Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen ( $p=0,0076$  (K);  $p=0,0129$  (K IFN)) (Abb. 25). Drei dieser Klone zeigten ein eindeutiges T<sub>H</sub>1 Zytokinprofil (1p1-4.1; 1p1-4.44; 2p1-4.5), ein Klon hingegen ein T<sub>H</sub>2 Profil (1p1-4.12). Während die IFN- $\gamma$  Produktion der T<sub>H</sub>1 Klone bis auf maximal 180% in Bezug zur Kontroll-Kultur gesteigert wurde, wies der T<sub>H</sub>2 Klon in der Ko-Kultur eine bis zu 5,4-fach erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion gegenüber der Kontroll-Kultur auf (386%- (K), 540%- (KIFN) Induktion ggü. Kontrolle (100%)). Diese massive Induktion des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN- $\gamma$  steht im Gegensatz zu den Befunden des *in vitro* Modells der allergischen Kontaktdermatitis.



**Abb. 25: Keratinozyten modulieren die Zytokinproduktion von Phl p 1-spezifischen T-Zellen**

Überstände der Ko-Kultur von Phl p 1-spezifischen T-Zellen wurden im ELISA auf die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 untersucht. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der Zytokinproduktion in der Anwesenheit von heterologen Keratinozyten im Vergleich zur Kontroll-Kultur (100%). Die Tabelle gibt die Signifikanz an. (n=23, Klone 8) (IFN- $\gamma$  100% =  $80613 \pm 2249$  pg/ml; IL-4 100% =  $238 \pm 63$  pg/ml; IL-10 100% =  $951 \pm 263$  pg/ml)

Alle untersuchten Phl p 1-spezifischen Klone reagierten, unabhängig von der Proliferation und analog zu den Ergebnissen mit Nickel-spezifischen T-Zellklonen, mit einer signifikanten Hemmung der IL-4 und IL-10 Produktion in der Anwesenheit von Keratinozyten (IL-4:

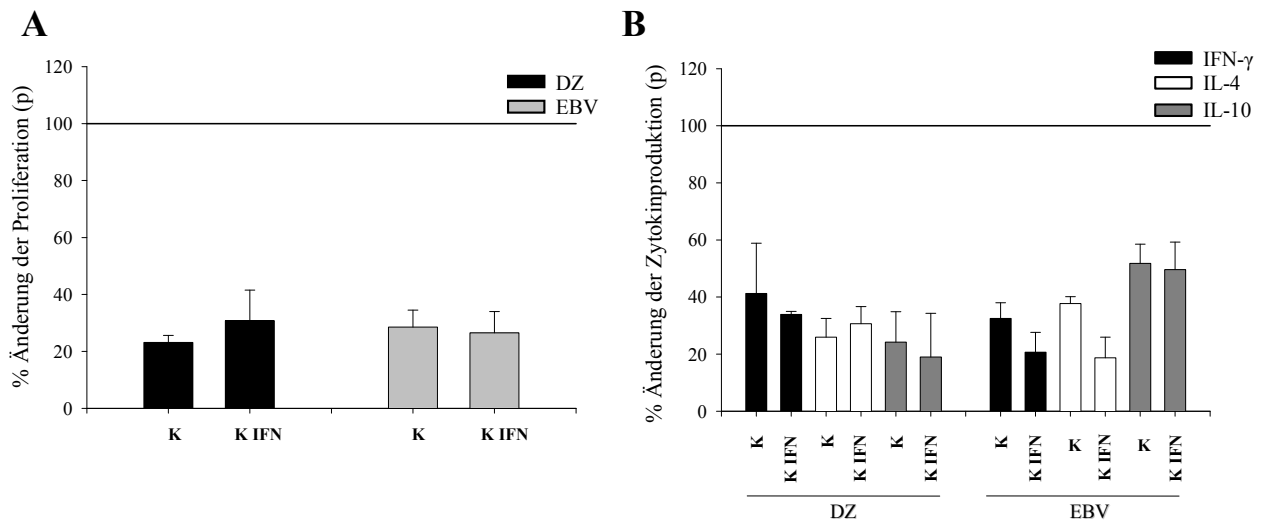
$p=3,6562 \times 10^{-10}$  (K);  $p=5,4301 \times 10^{-13}$  (KIFN); IL-10:  $p=1,5142 \times 10^{-9}$  (K);  $p=6,5749 \times 10^{-7}$  (KFIN) (Abb. 25). IL-10 stellt im *in vitro* Modell des atopischen Ekzems nicht das am stärksten gehemmte Zytokin dar; ein weiterer Unterschied zum Modell der allergischen Kontaktdermatitis. Unterschiede zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten konnten für IFN- $\gamma$  ( $p=0,0170$ ), nicht aber bei der IL-4 ( $p=0,6968$ ) und IL-10 ( $p=0,7859$ ) Veränderung ermittelt werden.

#### **4.5 Mechanismus der Keratinozyten-induzierten Modulation von T-Zell Effektorfunktionen**

##### 4.5.1 Die Modulation von T-Zell Effektorfunktionen ist unabhängig von der Art der Allergenpräsentation

Kontroll- und Ko-Kultur Experimente mit Nickel-spezifischen T-Zellklonen des Probanden 4Ni konnten sowohl mit EBV-transformierten B-Zellen als auch mit DZ als APZ durchgeführt werden. So war es möglich den Einfluss der Allergenpräsentation auf die modulierenden Eigenschaften von Keratinozyten innerhalb der Ko-Kultur zu untersuchen.

In Abb. 26 sind die Ergebnisse eines Nickel-spezifischen T-Zellklones (4Ni-4.106) repräsentativ für vier Klone gezeigt. Die Proliferation dieses Klones wurde, unabhängig von der Art der Allergen-präsentierenden Zelle, durch Keratinozyten gehemmt (Abb. 26, A). Auch die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 dieses Klones konnte in Gegenwart von Keratinozyten gehemmt werden; hier war ebenfalls kein Unterschied zwischen Ansätzen mit EBV-transformierten B-Zellen oder DZ zu erkennen (Abb. 26, B). Signifikanzen konnten für diese Experimente nicht angegeben werden, da die Zahl der durchgeführten Experimente bei  $n=2$  lag.



**Abb. 26: DZ versus EBV-transformierte B-Zelle**

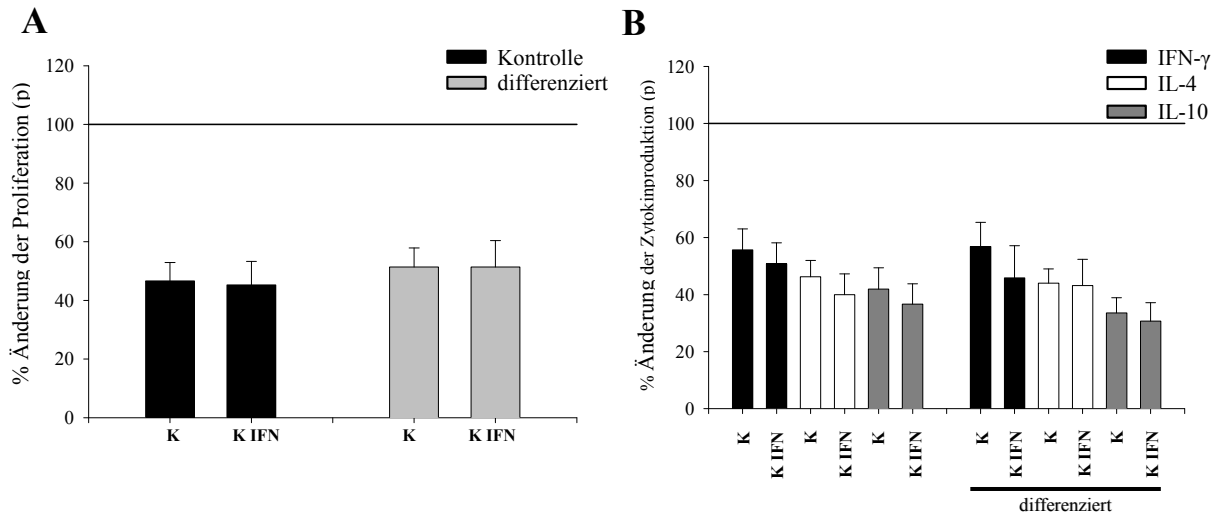
Der Ko-Kultur des Nickel-spezifischen T-Zellklons 4Ni-4.106 mit autologen Keratinozyten wurden entweder DZ oder EBV-transformierte B-Zellen als APZ zugefügt. In (A) ist die Änderung der Proliferation (p) und in (B) die Änderung der Zytokinproduktion (p) in Anwesenheit von Keratinozyten dargestellt. Experimente dieses Klones sind repräsentativ für drei weitere Klone gezeigt. (n=2, Klon 1) (DZ: IFN- $\gamma$  100% = 19735  $\pm$  9379 pg/ml; IL-4 100% = 235  $\pm$  147 pg/ml; IL-10 100% = 1851  $\pm$  1005 pg /ml; EBV: IFN- $\gamma$  100% = 36083  $\pm$  2402 pg/ml; IL-4 100% = 195  $\pm$  5 pg/ml; IL-10 100% = 882  $\pm$  251 pg /ml)

#### 4.5.2 Der Differenzierungsgrad der Keratinozyten hat keinen Einfluss auf deren modulierende Wirkung

Keratinozyten differenzieren in der Haut ausgehend entlang eines CaCl<sub>2</sub> Gradienten von teilungsfähigen, kernhaltigen Zellen der Basalmembran hin zu Keratin-haltigen, kernlosen Hornzellen. Um den Einfluss der Keratinozyten Differenzierung innerhalb der Ko-Kultur zu untersuchen, wurden primäre Keratinozyten in der Gegenwart von 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> für 24 Stunden differenziert und anschließend in die Ko-Kultur im Vergleich zu nicht differenzierten Keratinozyten eingesetzt.

Differenzierte autologe Keratinozyten hemmten die Proliferation von drei Nickel-spezifischen T-Zellklonen des Probanden 4Ni in gleichem Maße wie nicht differenzierte Keratinozyten (Abb. 27, A). Auch bezüglich der Zytokinproduktion war kein Unterschied zu erkennen, da differenzierte und nicht differenzierte Keratinozyten die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 in gleich starker Weise inhibierten (Abb. 27, B).

Der immunmodulierende Effekt der Keratinozyten auf T-Zellen ist somit unabhängig von deren Differenzierungsgrad.



**Abb. 27: Einfluss der Keratinozyten-Differenzierung auf die Ko-Kultur**

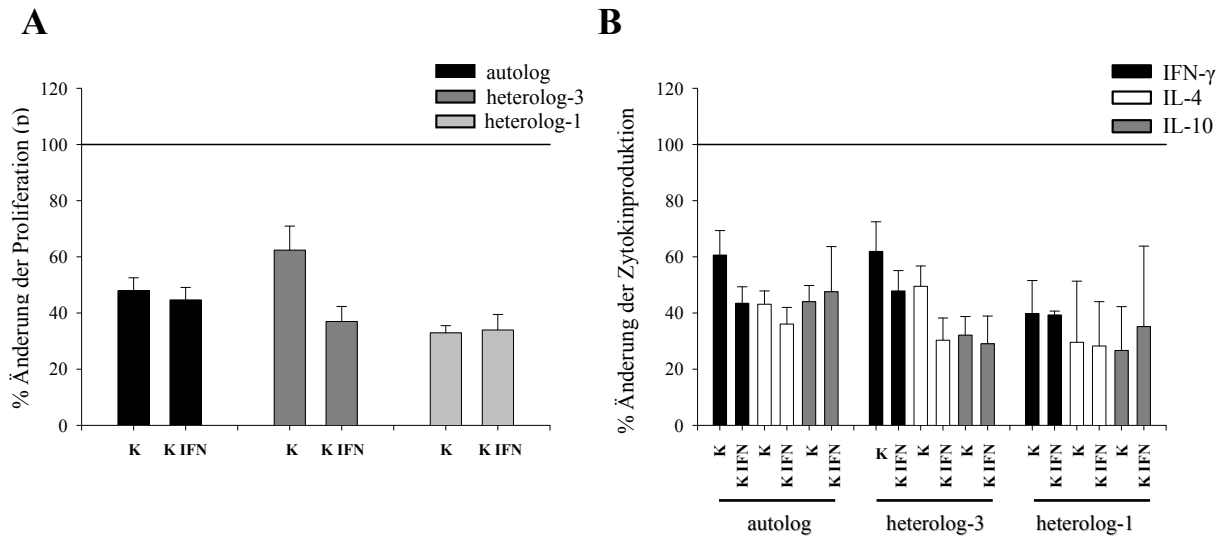
Keratinozyten des Probanden AC wurden mit 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> für 24 Stunden ausdifferenziert und im Vergleich zu nicht differenzierten Keratinozyten in die Ko-Kultur eingesetzt. In (A) ist der Einfluss der Keratinozyten auf die Proliferation und in (B) der Einfluss auf die Zytokinproduktion gezeigt. (n=7, Klone 3) (IFN- $\gamma$  100% = 37302  $\pm$  6956 pg/ml; IL-4 100% = 2317  $\pm$  703 pg/ml; IL-10 100% = 979  $\pm$  228 pg/ml)

#### 4.5.3 Autologe und heterologe Keratinozyten beeinflussen T-Zell Effektorfunktionen

Die bisher hier beschriebenen Wirkungen von Keratinozyten auf T-Zellen wurden ausschließlich im autologen System durchgeführt. Um nun zu klären, ob den modulierenden Eigenschaften von Keratinozyten eine Spender Abhängigkeit zu Grunde liegt, wurden neben autologen auch heterologe Keratinozyten in die Ko-Kultur eingesetzt.

In Abb. 28 sind die Ergebnisse von vier Nickel-spezifischen T-Zellklonen des Probanden 4Ni gezeigt, die entweder zusammen mit autologen Keratinozyten (autolog) oder heterologen Keratinozyten der ebenfalls Nickel-sensibilisierten Probanden 3Ni und 1Ni (heterolog-3 und heterolog-1) inkubiert wurden.

Autologe Keratinozyten hemmten die Proliferation und Zytokinproduktion der untersuchten T-Zellklone signifikant (Abb. 28, A und B)(Signifikanzen s. Tabelle in Abb. 28). Auch heterologe Keratinozyten der Probanden 3Ni und 1Ni waren dazu in der Lage; im Vergleich zu autologen Keratinozyten konnte kein Unterschied hinsichtlich der Intensität der Hemmung ermittelt werden.



Signifikanz	Proliferation	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
K aut/Kontrolle	$1,0493 \times 10^{-6}$	0,0104	$1,0631 \times 10^{-6}$	$1,7423 \times 10^{-5}$
K IFN aut/Kontrolle	$7,8649 \times 10^{-7}$	$8,1929 \times 10^{-6}$	$1,1042 \times 10^{-6}$	0,0700
K het-3/Kontrolle	0,5218	0,7264	0,2272	0,3525
K IFN het-3/Kontrolle	0,0562	0,7455	0,8044	0,6064
K het-1/Kontrolle	0,4215	0,4684	0,0810	0,5772
K IFN het-1/Kontrolle	0,5806	0,9467	0,7003	0,9426
K het-3/K aut	0,5218	0,7264	0,2272	0,3525
K IFN het-3/K IFN aut	0,0562	0,7455	0,8044	0,6064
K het-1/K aut	0,4215	0,4684	0,0810	0,5772
K IFN het-1/K IFN aut	0,5806	0,9467	0,7003	0,9426

**Abb. 28: Heterologe Keratinozyten hemmen Effektorfunktionen von T-Zellen**

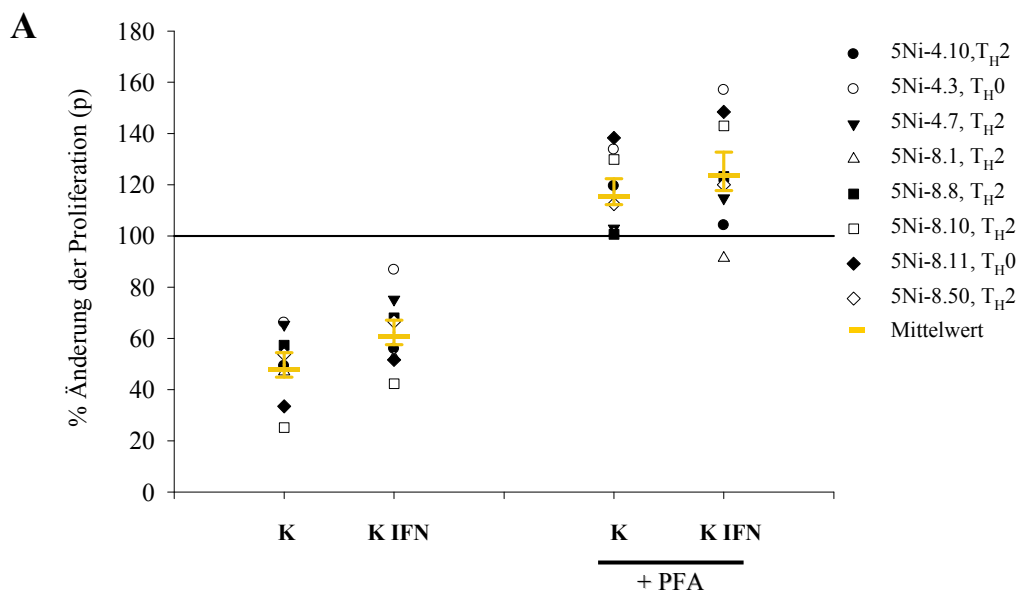
Neben autologen Keratinozyten (aut) wurden in die Ko-Kultur heterologe Keratinozyten der ebenfalls Nickel-sensibilisierten Probanden 3Ni (heterolog-3) und 1Ni (heterolog-1) eingesetzt. (A) zeigt die Änderung der Proliferation und (B) die Änderung der Zytokinproduktion in der Anwesenheit von Keratinozyten. Die Tabelle zeigt die Signifikanz der Experimente mit autologen Keratinozyten (oberer Teil) bzw. heterologen Keratinozyten ggü. autologen Keratinozyten (unterer Teil). (n=10, Klone 4) (IFN- $\gamma$  100% =  $18061 \pm 4559$  pg/ml; IL-4 100% =  $4215 \pm 2099$  pg/ml; IL-10 100% =  $604 \pm 256$  pg/ml)

Den modulierenden Eigenschaften von Keratinozyten auf die Effektorfunktionen von T-Zellen liegt somit möglicherweise ein genereller Mechanismus zugrunde, der nicht abhängig ist von Spender-spezifischen Faktoren wie z.B der Erkennung zwischen TZR und HLA-Molekül.

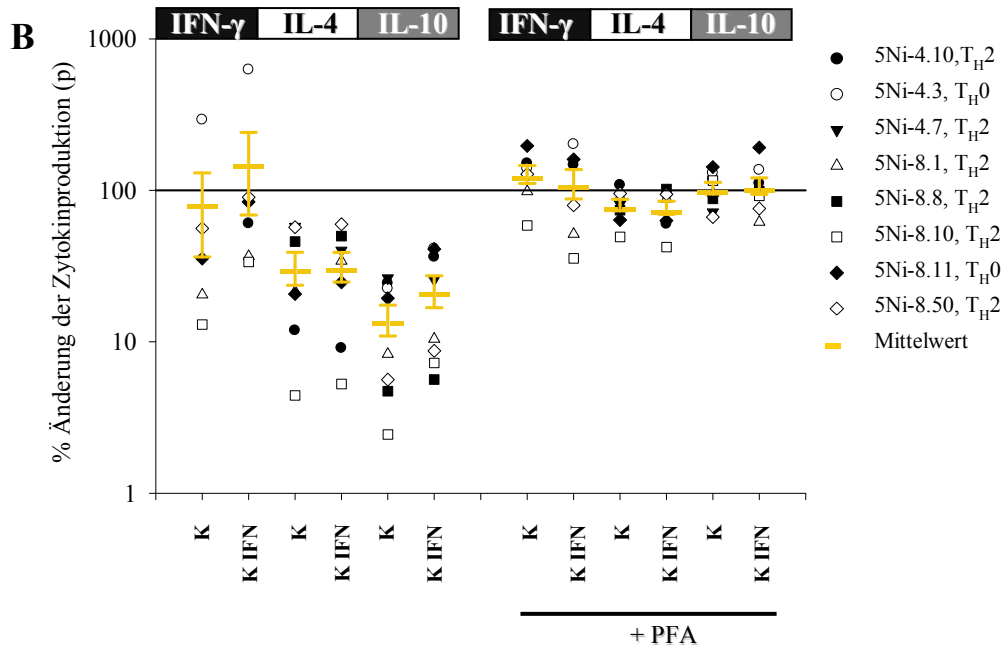
#### 4.5.4 Fixierung von Keratinozyten mit Paraformaldehyd

Keratinozyten könnten T-Zell Effektorfunktionen entweder Zell-Kontakt abhängig oder über lösliche Faktoren oder über eine Kombination beider Mechanismen regulieren. Um dies näher zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in die Ko-Kultur eingesetzt.

Nicht-fixierte Keratinozyten des Probanden 5Ni hemmten die Proliferation und die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 in den acht untersuchten Nickel-spezifischen T-Zellklonen signifikant (s. Tabelle in Abb. 29). PFA-fixierte Keratinozyten waren dazu nicht mehr in der Lage (Abb. 29). Die Hemmung der Zytokinproduktion entfiel ebenfalls vollständig durch die Fixierung der Keratinozyten. Diese Aufhebung der hemmenden Eigenschaften von Keratinozyten durch PFA-Fixierung war gegenüber nicht-fixierten Keratinozyten bezüglich der Proliferation und IL-4 und IL-10 Produktion signifikant; die IFN- $\gamma$  Produktion wurde nicht signifikant beeinflusst, da diese im eingesetzten Klonkollektiv uneinheitlich durch nicht-fixierte Keratinozyten reguliert wurde.







Signifikanz	Proliferation	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
K/Kontrolle	$2,348 \times 10^{-5}$	0,7674	0,0002	$4,6093 \times 10^{-8}$
K IFN/Kontrolle	0,0002	0,5863	0,0001	$2,2640 \times 10^{-6}$
K PFA/Kontrolle	0,0151	0,1989	0,3941	0,8717
K IFN PFA/Kontrolle	0,0161	0,6659	0,3234	0,6163
K PFA/K	0,0001	0,4797	0,0023	0,0001
K IFN PFA/K IFN	0,0002	0,6092	$6,4442 \times 10^{-6}$	$8,6483 \times 10^{-5}$

**Abb. 29: PFA-Fixierung der Keratinozyten hebt deren immunmodulierenden Effekt auf**

Keratinozyten des Probanden 5Ni wurden mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in die Ko-Kultur eingesetzt. (A) zeigt die Änderung der Proliferation (B) die Änderung der Zytokinproduktion der eingesetzten Nickel-spezifischen T-Zellklone in der Anwesenheit von nicht-fixierten und PFA-fixierten Keratinozyten. Die Tabelle gibt die Signifikanz der einzelnen Experimente wieder. (n=8, Klone 8) (IFN- $\gamma$  100% =  $776 \pm 464$  pg/ml; IL-4 100% =  $727 \pm 238$  pg/ml; IL-10 100% =  $378 \pm 167$  pg/ml)

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise lösliche, von Keratinozyten sezernierte Faktoren die Effektorfunktionen von T-Zellen modulieren; allerdings könnten durch die Fixierung Oberflächenstrukturen der Keratinozyten derart verändert worden sein, dass eine Modulation nicht mehr möglich war. Diese Frage wird im nächsten Abschnitt näher betrachtet.

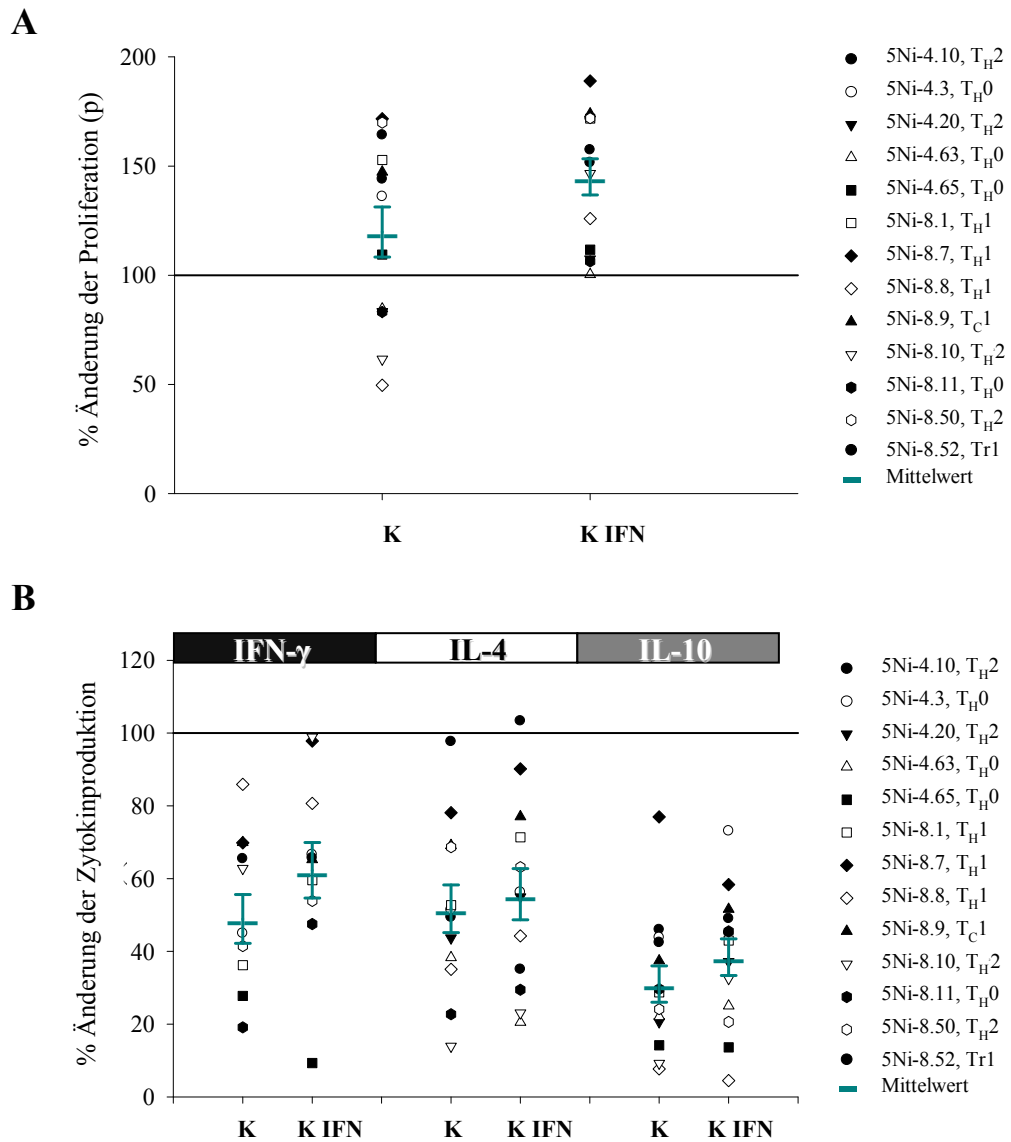
#### 4.5.5 Identifizierung löslicher Faktoren als Mediatoren der Modulation

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente ließen darauf schließen, dass möglicherweise lösliche Faktoren von Keratinozyten sezerniert werden, die über eine Distanz wirken und Effektorfunktionen von T-Zellen beeinflussen können. Allerdings konnte durch die Fixierung der Keratinozyten ein Einfluss auf Oberflächenstrukturen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Modulation wurden daher Ko-Kultur Experimente mit Keratinozyten-Überständen, sowie mit räumlicher Abtrennung von T-Zellen und Keratinozyten durch ein Zwei-Kammer System („Transwell“) durchgeführt. Die Ergebnisse diese Experimente werden im Folgenden erläutert.

##### 4.5.5.1 Zellfreie Keratinozyten-Überständen induzieren die T-Zellproliferation und hemmen die Zytokinproduktion

Keratinozyten sind der Lage, eine Vielfalt von Faktoren zu synthetisieren und zu sezernieren. Um nun lösliche Faktoren als mögliche Modulatoren der T-Zell Effektorfunktion zu identifizieren, wurden Keratinozyten-freie Überstände von Keratinozyten-Kulturen in Ko-Kultur Experimente eingesetzt (Prinzip des gepulsten Keratinozyten Überstandes, (Abb. 10)). Zellfreie Kulturüberstände von Keratinozyten des Probanden 5Ni induzierten, im Gegensatz zu Keratinozyten, die Proliferation von autologen Nickel-spezifischen T-Zellklonen signifikant ( $p=0,0454$  (K);  $p=3,1686 \times 10^{-5}$  (KIFN)) (Abb. 30, A). Trotz der Proliferations-stimulierenden Eigenschaft der Überstände hemmten diese die Zytokinproduktion der untersuchten T-Zellklone. Die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 wurde im untersuchten Klonkollektiv signifikant unterbunden (Abb. 30, B). IL-10 stellte analog zu den Daten mit Keratinozyten wiederum das am stärksten gehemmte Zytokin dar.

ERGEBNISSE



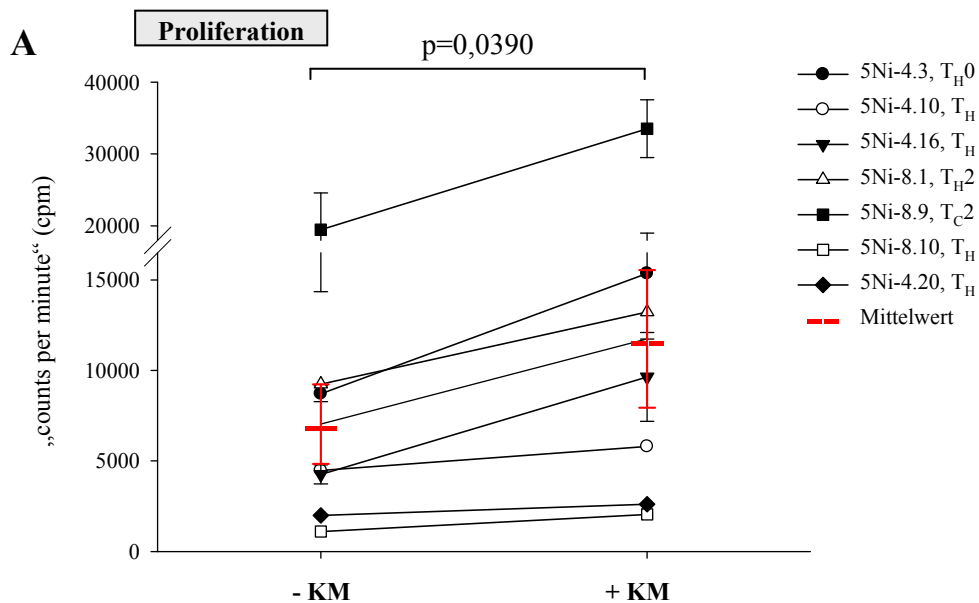
Signifikanz	Proliferation	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
K/Kontrolle	0,0454	$2,8257 \times 10^{-5}$	$3,3076 \times 10^{-9}$	$1,6655 \times 10^{-15}$
K IFN/Kontrolle	$3,1686 \times 10^{-5}$	0,0003	$3,6847 \times 10^{-9}$	$4,6678 \times 10^{-16}$
K/K IFN	0,0012	0,0434	0,2421	0,0332

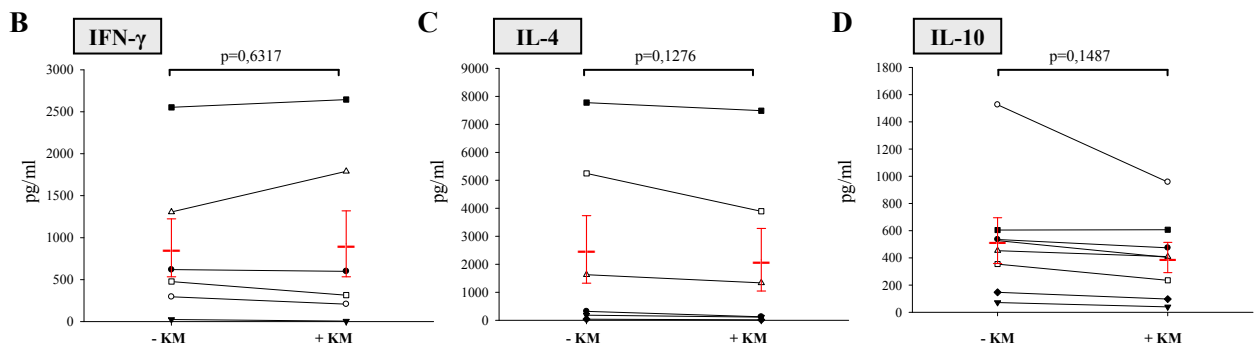
**Abb. 30: Keratinozyten Kulturüberstände modulieren Effektorfunktionen von T-Zellklonen**

Zellfreie Überstände von Keratinozytenkulturen induzieren die Proliferation und hemmen die Zytokinproduktion von Nickel-spezifischen T-Zellklonen. (n=34, Klone 13) (IFN- $\gamma$  100% =  $814 \pm 237$  pg/ml; IL-4 100% =  $1736 \pm 453$  pg/ml; IL-10 100% =  $613 \pm 207$  pg/ml)

*Das Keratinozyten-Medium induziert die T-Zellproliferation, hat aber keinen Effekt auf die Zytokinproduktion*

Keratinozyten-Überstände induzierten die Proliferation von Nickel-spezifischen T-Zellklonen (Abb. 30, A). Die Überstände wurden in gleichem Volumen (50 µl) zur Ko-Kultur gegeben wie Keratinozyten selbst. Allerdings war das Grundmedium hier nicht Proliferationsmedium sondern Keratinozytenmedium. Dieses Keratinozytenmedium enthält eine Vielfalt von Bestandteilen, wie z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Insulin, Epinephrin, die speziell auf die Bedürfnisse von Keratinozyten zugeschnitten sind und die dem Proliferationsmedium fehlen. Das Keratinozytenmedium stand daher im Verdacht die Proliferation der T-Zellen zu induzieren. Um diese Überlegung näher zu untersuchen, wurden Nickel-spezifische T-Zellklone mit APZ und Nickel in An- oder Abwesenheit von 50 µl Keratinozytenmedium inkubiert und die Proliferation der T-Zellen verglichen (Abb. 31, A). Das Keratinozytenmedium induzierte signifikant ( $p=0,039$ ) die Proliferation der T-Zellklone. Die Produktion von IFN- $\gamma$  ( $p=0,6316$ ), IL-4 ( $p=0,1276$ ) und IL-10 ( $p=0,1487$ ) hingegen wurde nicht beeinflusst (Abb. 31, B-D). Die Ergebnisse aus Abb. 30 können bezüglich der induzierten Proliferation somit nicht ausgewertet werden, da eine Kontrolle mit Keratinozytenmedium in diesen Experimenten nicht mitgeführt wurde.



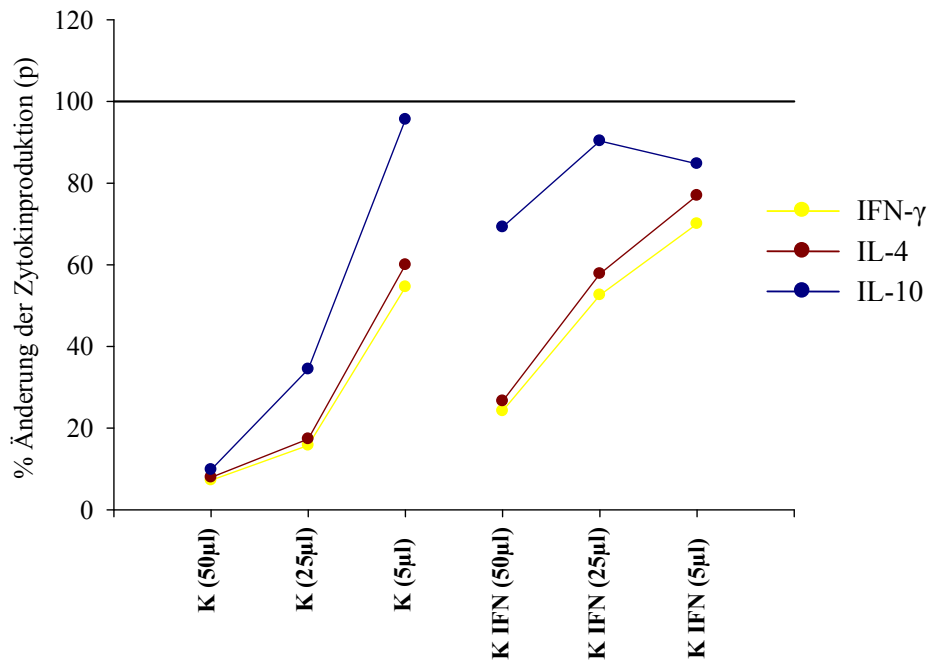


**Abb. 31: Das Keratinozytenmedium induziert die Proliferation von T-Zellen**

T-Zellklone wurden zusammen mit DZ und Nickel in der Gegenwart (+KM) oder Abwesenheit (-KM) von Keratinozytenmedium inkubiert und die spezifische Proliferation (A) und Zytokinproduktion (B-D) der Klone 48 Stunden nach Kultur-Ansatz bestimmt. Das Keratinozytenmedium wurde in gleichem Volumen zugegeben wie Überstände von Keratinozytenkulturen (50  $\mu$ l). (n=1, Klone 7)

*Die Hemmung der Zytokinproduktion durch Keratinozyten-Überstände ist dosis-abhängig*

Keratinozyten-Überstände hemmten die Zytokinproduktion von T-Zellen dosis-abhängig. Dieser Effekt ist anhand des Nickel-spezifischen T-Zellklons 5Ni-4.3 stellvertretend für zwei weitere Klone gezeigt (Abb. 32). Der T-Zellklon wurde mit verschiedenen Volumina autologer Keratinozyten-Überständen (5  $\mu$ l-50  $\mu$ l) inkubiert und die Zytokinproduktion bestimmt. Das größte Volumen an Überständen (50  $\mu$ l) ruhender und inflammatorischer Keratinozyten hemmte die Produktion der Zytokine am effektivsten. Dahingegen hatten 5  $\mu$ l des Überstands nur noch einen marginalen Effekt.



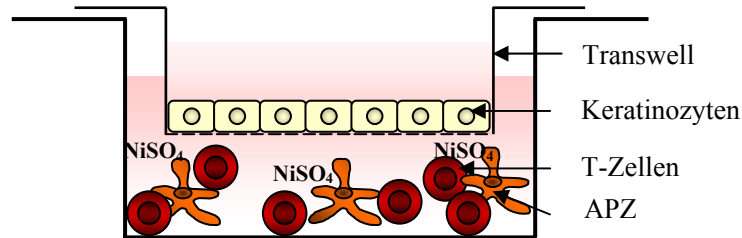
**Abb. 32: Dosis-abhängige Hemmung der Zytokinproduktion durch Keratinozyten-Überstände**

In die Ko-Kultur wurden Keratinozyten-Überstände von ruhenden (K) und inflammatorischen Keratinozyten (KIFN) Kulturen eingesetzt. Es wurden entweder 50  $\mu$ l des Überstandes oder 25  $\mu$ l bzw. 5  $\mu$ l zu den T-Zellen gegeben. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Nickel-spezifischen T-Zellklones (5Ni4.3) stellvertretend für zwei weitere Klone.

#### 4.5.5.2 Keratinozyten hemmen im Zwei-Kammersystem die Effektorfunktionen von T-Zellen

Die Ergebnisse der Ko-Kultur Experimente mit PFA-fixierten Keratinozyten und Überständen von Keratinozytenkulturen lieferten deutliche Hinweise auf einen oder mehrere lösliche von Keratinozyten produzierte Faktoren, die in der Lage sind, T-Zell Effektorfunktionen zu modulieren. Dieser Effekt sollte durch die Verwendung eines Zwei-Kammersystems („Transwell“) weiter bestätigt werden. Anhand eines „Transwell“-Einsatzes ist es möglich innerhalb einer gemeinsamen Kultur, Zellpopulationen räumlich voneinander abzutrennen. In der Ko-Kultur wurden T-Zellen/APZ/Nickel in der unteren Kammer und Keratinozyten in der oberen Kammer inkubiert (Abb. 33). Durch einen Filter in der oberen Kammer mit einer Porengröße von 0,2  $\mu$ m ist ein Passieren der Zellen von der oberen zur unteren Kammer und

umgekehrt unmöglich, jedoch kann über die Poren ein Austausch von löslichen Faktoren stattfinden. Falls Keratinozyten T-Zell Effektorfunktionen über einen löslichen Mediator modulieren, sollte dieser Effekt auch im Zwei-Kammersystem zugegen sein.



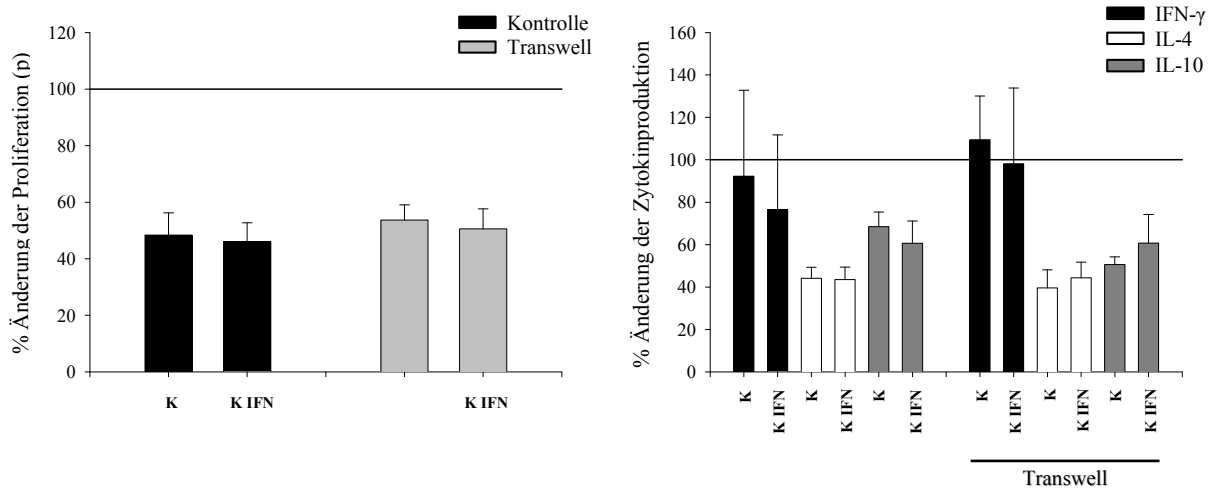
**Abb. 33: „Transwell“ Ko-Kultur**

Mittels eines „Transwell“-Einsatzes wurden innerhalb der Ko-Kultur T-Zellen von Keratinozyten räumlich getrennt. T-Zellen wurden zusammen mit APZ und Allergen in der unteren Kammer und Keratinozyten in der oberen Kammer inkubiert. Durch Poren im Einsatz kann ein Austausch von Stoffen zwischen beiden Kammern erfolgen.

In Abb. 34 sind die Ergebnisse der Ko-Kultur im Zwei-Kammersystem gezeigt. Keratinozyten, die in der oberen Kammer abgetrennt von Nickel-spezifischen T-Zellen inkubiert wurden, waren in der Lage, die Allergen-spezifische Proliferation ebenso zu hemmen wie Keratinozyten, die zusammen mit den T-Zellen inkubiert wurden. Auch bezüglich der Zytokinproduktion konnte kein Unterschied zwischen Keratinozyten im „Transwell“ und der Ko-Kultur ermittelt werden. Die Hemmung von IFN- $\gamma$  ist in dieser Form der Darstellung nicht erkennbar, da einer der untersuchten Klone (5Ni-4.22) massiv in seiner IFN- $\gamma$  durch Keratinozyten induziert wurde und somit im Mittel aller Experimente die Hemmung der anderen Klone schematisch aufgehoben wird. Die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 war signifikant gehemmt.

Die modulierenden Eigenschaften von Keratinozyten auf die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen sind somit unabhängig von einem direkten Zellkontakt und werden über einen oder mehrere lösliche Faktoren übermittelt.

## ERGEBNISSE



Signifikanz	Proliferation	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
K/Kontrolle	0,0009	0,8794	$6,0462 \times 10^{-5}$	0,0088
K IFN/Kontrolle	0,0003	0,6046	0,0001	0,0189
K TW/Kontrolle	0,0002	0,7167	0,0006	$6,2841 \times 10^{-5}$
K IFN TW/Kontrolle	0,0006	0,9672	0,0005	0,04514
K TW/K	0,5283	0,5163	0,5053	0,0191
K IFN TW/K IFN	0,5208	0,0165	0,9178	0,9942

**Abb. 34: Keratinozyten im „Transwell“-Einsatz hemmen Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellklonen**

Keratinozyten wurden abgetrennt von T-Zellen in einem „Transwell“-Einsatz inkubiert und die Effekte auf Nickel-spezifische T-Zellen im Vergleich zur normalen Ko-Kultur ermittelt. In der Tabelle sind die Signifikanzen der einzelnen Ansätze wiedergegeben. (n=7, Klone 5) (IFN- $\gamma$  100% =  $2414 \pm 1054$  pg/ml; IL-4 100% =  $426 \pm 151$  pg/ml; IL-10 100% =  $364 \pm 157$  pg/ml)



## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden autologe, Allergen-spezifische *in vitro* Modelle für zwei der häufigsten allergischen Erkrankungen der Haut - die allergische Kontaktdermatitis und das atopische Ekzem - etabliert. Innerhalb dieser Modelle war es möglich die Rolle von Keratinozyten während der Ekzemreaktion mit besonderem Augenmerk auf die Effektorphase und die Limitierung näher zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass Keratinozyten wichtige Effektorfunktionen von T-Zellen, wie Proliferation und Zytokinsekretion, modulieren und somit empfindlich in die immunologischen Vorgänge der Ekzemreaktion eingebunden sind.

Die Allergen-spezifische Proliferation wurde in der Anwesenheit von Keratinozyten sowohl in der Mehrheit der untersuchten Nickel-spezifischen als auch der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone unterdrückt (84% bzw. 75%), in einer Minderheit fand sich eine Induktion (16% bzw. 25%). Während die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 in beiden Modellen und in allen Klonen unabhängig von der Proliferation durch Keratinozyten gehemmt wurde, zeigte das T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  im Modell der allergischen Kontaktdermatitis eine uneinheitliche Regulation im Nickel-spezifischen Klonkollektiv. Im Modell des atopischen Ekzems hingegen zeigte sich in der Gegenwart von Keratinozyten eine signifikante Induktion der IFN- $\gamma$  Sekretion in Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen. Während die in ihrer IFN- $\gamma$  Sekretion induzierten Nickel-spezifischen T-Zellklone ausschließlich einen T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>0 Phänotyp aufwiesen befand sich innerhalb der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone auch ein T<sub>H</sub>2 Klon. Der Mechanismus der Modulation von T-Zell Effektorfunktionen durch Keratinozyten konnte in weiterführenden Experimenten auf lösliche Mediatoren zurückgeführt werden.

Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse rücken Keratinozyten aus dem Licht der reinen Zeilzelle während der Ekzemreaktion hin zu einer immunologisch aktiven Zelle, die den Verlauf und den Ausgang der Entzündungsreaktion mitbestimmt.

## 5.1 Charakterisierung der generierten T-Zellklone

Die in dieser Arbeit isolierten Nickel- und Phl p 1-spezifischen T-Zellklone wurden hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker und ihres Subtypes umfangreich analysiert.

Zur Bestimmung des T-Zell Subtypes (Typ0, Typ1, Typ2, Tr1) wurde die Definition nach Sager et al. als Grundlage herangezogen [151]. Die in der zitierten Arbeit isolierten Der p 1-spezifischen T-Zellklone wurden anhand der Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 analysiert: Als Typ1 Zellen definierten sich T-Zellen, die eine IFN- $\gamma$  Produktion  $<1,25$  ng/ml (entspricht 84% an der Gesamtzytokinproduktion) bei einer gleichzeitigen IL-4 Produktion  $>0,25$ ng/ml aufwiesen (entspricht 16% an der Gesamtzytokinproduktion). Typ2 T-Zellen zeichneten sich durch ein umgekehrtes Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-4 aus. T-Zellen, die sowohl IFN- $\gamma$ , als auch IL-4 produzierten, wurden als Typ0 Zellen bezeichnet. Auf die Gesamtzytokinproduktion bezogen definierten sich Typ1 Zellen also aus einer IFN- $\gamma$  zu IL-4 Produktion von 84% zu 16% und Typ2 Zellen aus einem Verhältnis von IFN- $\gamma$ /IL-4 von 16%/84%.

Zur Subtyp Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit generierten T-Zellklone wurde zusätzlich zu den Zytokinen IFN- $\gamma$  und IL-4, IL-10 als weiterer Parameter bestimmt. Die Definition nach Sager wurde wie folgt modifiziert:

Als Typ1 Zellen wurden Klone gewertet, die mehr als 80% IFN- $\gamma$ , kein IL-4 und weniger als 20% IL-10 produzierten. Typ2 Zellen wurden entweder charakterisiert durch eine IL-4 Produktion größer 60% mit einer gleichzeitigen IFN- $\gamma$  Produktion kleiner 20% oder durch eine Summe der IL-4 und IL-10 Produktion größer 85%. Typ0 produzierten alle drei Zytokine in gleicher Menge oder IFN- $\gamma$  und IL-10 oder IFN- $\gamma$  und IL-4 oder IL-4 und IL-10 zu jeweils 50%. Eine Produktion des regulatorisch wirksamen Zytokins IL-10  $>65\%$  definierte bei gleichzeitiger Expression von weniger als 35% IFN- $\gamma$  und/oder IL-4 regulatorische T-Zellen vom Tr1 Typ (s. Abb. 7).

### 5.1.1 Charakterisierung der Nickel-spezifischen T-Zellklone

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit isolierten 32 Nickel-spezifischen T-Zellklone zeigten eine deutliche Dominanz von CD4<sup>+</sup> (90,6%) gegenüber CD8<sup>+</sup> (9,4%) Klonen. In der weiteren Unterteilung der Klone in Typ0, Typ1 und Typ2 Zellen konnte ein Verteilungsmuster von 21,8% zu 34,4% und 34,4% ermittelt werden (s. Tabelle 6). Werfel et al. wendeten die

Definition nach Sager et al. zur Bestimmung der T-Zell Subtypen innerhalb eines Nickel-spezifischen Klonkollektives an und berichteten ebenfalls über ein vermehrtes Auftreten von CD4<sup>+</sup> Nickel-spezifischen T-Zellen (77%), jedoch über eine andersartige Verteilung der Subtypen (Typ0: 43%; Typ1: 47%; Typ2: 6%) [198] (s. Tabelle 6). Diese Unterschiede sind einerseits erklärbar durch das deutlich größere Klonkollektiv (252 Klone) in der Arbeit von Werfel und andererseits durch das zusätzliche Einbeziehen des Zytokins IL-10 in die Definition des Zytokinprofils in der vorliegenden Arbeit. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt im veränderten Zytokinprofil der Klone des Probanden 5Ni; innerhalb dieses Klonpools konnten keine Nickel-spezifischen Typ1 Zellen, sondern ausschließlich Typ2 Zellen (56,3%), Typ0 Zellen (31,3%) und Tr1 Zellen (12,3%) isoliert werden. Ein Grund für die Dominanz von Typ2 Zellen bei diesem Probanden ist möglicherweise die zusätzliche Monosensibilisierung gegen das Birken major Allergen Bet v 1 (spez. IgE: 0,85kU/l (Rast Klasse 2)), die mit einer Neigung zu Typ2 vermittelten Immunantworten einhergehen könnte. Betrachtet man das Zytokinprofil der Klone der anderen vier Probanden (1Ni, 2Ni, 3Ni, 4Ni), die eine isolierte Nickel-Sensibilisierung aufweisen, so ergibt sich ein Bild, das eine eindeutige Dominanz von Typ1 Zellen (73,3%) bei gleichzeitiger Unterrepräsentation von T<sub>H</sub>0 und Typ2 Zellen (jeweils 13,3%) zeigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Tatsache, dass es sich bei der Kontaktreaktion auf Nickel um eine hauptsächlich Typ1 vermittelte Immunreaktion handelt.

Eine Einteilung der T-Zellklone alleine anhand ihres Zytokinprofils scheint daher schwierig, und sollte in weiteren Studien um die zusätzliche Analyse von Subpopulations-spezifischen Transkriptionsfaktoren wie T-bet (T<sub>H</sub>1), GATA-3 (T<sub>H</sub>2) und FoxP3 (Treg) und die Expression von Chemokinrezeptoren erweitert werden.

	Kollektiv	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	Typ0	Typ1	Typ2	Tr1
Werfel et al. Blut [198]	252	77%	21%	43%	47%	6%	10-15%[6]
Klone in dieser Arbeit	32	90,6%	9,4%	21,8%	34,4%	34,4%	9,4%
Klone 5Ni	16	87,5%	12,5%	31,3%	-	56,3%	12,5%
Klone 1-4Ni	16	93,8%	6,3%	13,3%	73,3%	13,8%	6,3%

**Tabelle 6: Verteilung der T-Zell Subtypen im Nickel-spezifischen Klonkollektiv im Vergleich zur Literatur**

---

T-Zellklone, die als Hauptzytokin IL-10 (<65%) produzierten, wurden als regulatorische T-Zellen vom Tr1 Typ definiert. Tr1 Zellen hemmen über die Sekretion von IL-10 die Effektorfunktionen verschiedener Zielzellen. Über die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren und des CLA-Moleküls können Tr1 Zellen in die Haut wandern und dort die Aktivierung von Nickel-spezifischen Typ1 Zellen durch ihren hemmenden Einfluss auf DZ unterbinden [165]. Innerhalb der generierten Nickel-spezifischen T-Zellklone fanden sich Tr1 Zellen mit einer Frequenz von 9,4 % ausschließlich in der CD4<sup>+</sup> T-Zell Population. Diese Beobachtung stimmt mit Daten von Akdis et al. überein, die eine Frequenz von 10-15% an CD4<sup>+</sup> Tr1 Zellen ermittelte und durch Hochrechnung auf die gesamte CD4<sup>+</sup> Population eine Frequenz von 0,1-0,0007% Allergen-spezifischer Tr1 Zellen zeigte [6].

Innerhalb des isolierten Klonkollektives konnten zudem Nickel-spezifische „Selfpresenter“ Klone isoliert werden. Diese T-Zellen, die zur Induktion einer spezifischen Proliferation auf Nickelsulfat keine professionelle APZ benötigen, wurden erstmals von Nasorri et al. beschrieben [120]. In der vorliegenden Arbeit, die als zweiter Bericht über diese Untergruppe Nickel-spezifischer T-Zellen zu sehen ist, lag die Frequenz der „Selfpresenter“ mit 25% etwas unter der von Nasorri beschriebenen (35%). Der Großteil der „Selfpresenter“ Klone gehörte dem Typ1 Subtyp (75%) an, jeweils ein Klon zeigte einen Typ0 bzw. Typ2 Phänotyp (jeweils 12,5%). „Selfpresenter“ Klone konnten zudem ausschließlich von Probanden mit einer isolierten Nickel-Sensibilisierung (1Ni, 2Ni, 3Ni, 4Ni) und einer generellen Dominanz Nickel-spezifischer Typ1 T-Zellen isoliert werden. Von Proband 5Ni, bei dem Nickel-spezifische Typ2 Zellen überwogen, konnten keine „Selfpresenter“ generiert werden. Auch diese Beobachtung stimmt mit der von Nasorri et al. gezeigten Dominanz von Typ1-Zellen innerhalb der Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ Subpopulation überein und legt eine Rolle dieser T-Zellen bei der Typ1 dominierten Immunreaktion der allergischen Kontaktdermatitis nahe.

### 5.1.2 Charakterisierung der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone

Das Klonkollektiv der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone umfasste acht Klone von zwei *Phleum pratense* sensibilisierten Probanden (1p1 und 2p2). Diese Klone gehörten alle der CD4<sup>+</sup> Subpopulation an und zeigten eine gleiche Verteilung von Typ1 und Typ2 Zellen

(jeweils 37,5%) und einen Anteil von 25% Tr1 Zellen. Akdis et al. berichten über eine Dominanz Allergen-spezifischer Typ2 T-Zellen und eine verringerte Anzahl an IL-10 produzierenden Tr1 Zellen bei Allergikern gegenüber gesunden Kontrollen [6]. Dieses Verteilungsmuster konnte innerhalb des in der vorliegenden Arbeit isolierten Klonkollektives nicht bestätigt werden. Jedoch ist sowohl die Anzahl der generierten Phl p 1-spezifischen T-Zellklone als auch die Probandenzahl zu gering um definitive Aussagen machen zu können.

Die Generierung von CD8<sup>+</sup> Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen gelang nicht. Jedoch konnte eine spezifische Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zelllinie mit nativem Phl p 1 erzielt werden (PI bei Proband 1p1: 16,1; bei Proband 2p1: 7,3). Die Zahl der aus der Linie klonierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag bei Proband 1p1 mit sechs Klonen deutlich unter der Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellklone (53). Einer dieser CD8<sup>+</sup> Klone wurde mit einem PI von 2,37 spezifisch auf natives Phl p 1 getestet, verlor jedoch seine Spezifität nach erneutem Auftauen. Die geringere Frequenz von CD8<sup>+</sup> gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen innerhalb der Phl p 1-spezifischen und Nickel-spezifischen T-Zellen ist möglicherweise durch die erhöhte Anfälligkeit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) erklärbar [101]. Der Verlust der Spezifität des CD8<sup>+</sup> aber auch vieler CD4<sup>+</sup> Phl p 1-spezifischen T-Zellklone nach Reaktivierung aus flüssigem Stickstoff bleibt ungeklärt. Vorstellbar wäre eine oder mehrere Mutationen innerhalb der TZR-codierenden Region, die durch die starke Stimulation des T-Zell Wachstums hervorgerufen werden und eine Erkennung des MHC-Allergen Komplexes durch die T-Zelle unmöglich machen.

Eine von professionellen APZ unabhängige Antigen-Präsentation von Aeroallergenen oder Allergenen aus Nahrungsmitteln ist unseren Recherchen nach in der Literatur nicht beschrieben. Auch in unserem Phl p 1-spezifischen Klonkollektiv zeigte sich ausschließlich eine APZ-abhängige Proliferation.

## 5.2 Morphologische Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Zellen

In *in situ* Arbeiten konnte die Infiltration von T-Zellen in die Dermis und auch Epidermis während einer allergisch inflammatorischen Hautreaktion auf Pollen anschaulich gezeigt werden [54]. Jedoch bieten diese immunhistochemischen Befunde nur einen Nachweis von T-Zellen und anderen Zellpopulationen in der Haut, liefern aber keine Information über die Wechselwirkungen der einzelnen Zellen untereinander. Daher wurde in der vorliegenden

Arbeit die Interaktion von T-Zellen und Keratinozyten in einem *in vitro* Modell versucht nachzustellen. In einem ersten Ansatz sollte der zelluläre Diskurs lichtmikroskopisch verfolgt werden. Über einen Zeitraum von sechs Stunden wurden die Wechselwirkungen der T-Zellen des Nickel-spezifischen Klonen 5Ni-4.10 mit einem im Gesichtsfeld liegenden Keratinozyten in ein Minuten Intervallen beobachtet. Die Kontakte von Keratinozyten und T-Zellen dauerten zwischen drei bis 57 Minuten. Zwei Kontakte mit der Dauer von drei bzw. 54 Minuten bewirkten innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine Formveränderung des Keratinozyten. Im Anschluss an diese Formveränderung wies der Keratinozyt eine etwas granulärer wirkende Kernstruktur auf, die jedoch nicht in der Ablösung der adhärenen Zelle von der Kulturplatte und somit anscheinend nicht in Apoptose endete. Bei dem in die Untersuchung eingesetzten T-Zellklon handelte es sich um eine T<sub>H</sub>1 Zelle, die potentiell in MHC-abhängiger Weise über Fas/FasL und Perforin/GranzymB vermittelte Mechanismen Apoptose in Zielzellen induzieren könnte [183]. Warum dieser T-Zellklon nicht in der Lage ist, den Keratinozyten in Zelltod zu schicken ist unklar. Vorstellbar wäre, dass die in die Untersuchung eingesetzten unstimulierten Keratinozyten aufgrund der fehlenden Wirkung von IFN- $\gamma$  und der damit verbundenen geringeren Expression von Fas und MHC-Klasse II Molekülen durch die T-Zelle nicht oder zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Apoptose gebracht werden können. Weiterführende Experimente sollten daher auch einen späteren Zeitpunkt, z.B. 48 oder 72 Stunden nach Ko-Kultur Beginn, im Plateau der Effektorphase, und um eine bestehende Entzündungsreaktion zu immitieren zusätzlich mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten Keratinozyten durchgeführt werden

Diese Arbeit lieferte möglicherweise einen weiteren Erklärungsansatz für die nicht stattfindende Apoptoseinduktion dieses T-Zellklones in Keratinozyten – die Modulation seiner Effektorfunktion durch Keratinozyten. 5Ni-4.10 wurde sowohl in seiner Allergen-spezifischen Proliferation als auch in der Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 durch die Anwesenheit autologer Keratinozyten gehemmt. Eine durch IFN- $\gamma$  vermittelte Aufregulation von Fas auf Keratinozyten und somit erhöhte Anfälligkeit des Keratinozyten für Apoptose sollte innerhalb dieser Ko-Kultur somit nicht mehr möglich sein [185]. Unklar bleibt jedoch aus unseren Experimenten, ob Keratinozyten auch Einfluss auf die Perforin/GranzymB vermittelte Apoptose haben.

In dieser Arbeit konnten wir zudem zeigen, dass die Modulation der T-zellulären Effektorfunktion von löslichen Keratinozyten-Mediatoren überbracht wird. Die im Lichtmikroskop gezeigten engen Interaktionen beider Zellen dienen somit nicht der

Modulation von Proliferation und Zytokinproduktion in der T-Zelle. Da diese Kontakte z.T. sehr lange andauern und eben nicht im Tod des Keratinozyten enden, ist vorstellbar, dass sie seitens der T-Zelle z.B. zum Abtasten des Keratinozyten nach von diesem exprimierten Oberflächenmolekülen wie MHC-Molekülen, Fas oder Adhäsionsmolekülen genutzt werden.

### **5.3 Keratinozyten modulieren die Allergen-spezifische T-Zell Proliferation und Zytokinproduktion**

Der Einfluss von Keratinozyten auf Effektorfunktionen von T-Zellen wurde innerhalb eines *in vitro* Modelles der Ekzemreaktion untersucht. Autologe Keratinozyten wurden mit T-Zellklonen (Nickel- bzw. Phl p 1-spezifisch), Allergen (Nickelsulfat bzw. natives Phl p 1) und APZ ko-kultiviert. Die Allergen-spezifische Proliferation der T-Zellklone wurde über <sup>3</sup>H-Thymidin Inkorporation während der Zellteilung und die Zytokinproduktion mittels ELISA aus zellfreien Ko-Kulturüberständen bestimmt. Durch Vergleich der Ko-Kultur Daten mit Daten aus der Kontroll-Kultur, die ohne Keratinozyten durchgeführt wurde, errechnete sich die prozentuale Änderung der Proliferation bzw. Zytokinproduktion der T-Zellklone in der Anwesenheit von autologen Keratinozyten.

#### **5.3.1 Keratinozyten modulieren die Effektorfunktionen von Nickel-spezifischen T-Zellklonen**

##### **5.3.1.1 Proliferations-gehemmte Nickel-spezifische T-Zellklone**

Mehr als drei Viertel der untersuchten der Nickel-spezifischen T-Zellklone (84%) wurde in der Anwesenheit von Keratinozyten in ihrer Allergen-spezifischen Proliferation gehemmt. Die Proliferations-hemmende Kapazität von Keratinozyten auf einzelne T-Zellklone war unterschiedlich stark ausgeprägt; so wurden wenige Klone nur etwa 10% gehemmt, wohingegen bei anderen Klonen die spezifische Proliferation fast vollständig blockiert wurde; die Mehrheit der Klone bewegte sich in einem Intervall von 70%-20% Hemmung der spezifischen Proliferation, was sich auch im Mittelwert (etwa 60%) aller Experimente widerspiegelt. IFN- $\gamma$  Vorstimulation der Keratinozyten führte zu keiner signifikanten

Änderung der anti-proliferativen Wirkung von Keratinozyten auf Nickel-spezifische T-Zellklone.

In Proliferations-gehemmten Klonen wurde zudem die Produktion von Zytokinen durch autologe Keratinozyten moduliert.

Das  $T_H1$  Zytokin  $IFN-\gamma$  wurde nicht einheitlich reguliert; Proliferations-gehemmte Nickel-spezifische Klone zeigten ein heterogenes Bild mit einer gehemmten  $IFN-\gamma$  Produktion in 90,6% und einer Induktion in 9,4% der Klone. Keratinozyten sind somit in der Lage die  $IFN-\gamma$  Sekretion bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation zu induzieren. Dies deutet auf unterschiedliche Modulationsmechanismen der T-zellulären Proliferation und Zytokinproduktion durch Keratinozyten hin. Ein signifikanter Unterschied in der immunmodulierenden Wirkung zwischen ruhenden und inflammatorischen Keratinozyten konnte nicht identifiziert werden. Tendentiell scheinen jedoch  $IFN-\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten die  $IFN-\gamma$  Freisetzung etwas weniger stark zu hemmen. Ein Verschleppen von  $IFN-\gamma$  aus der Vorstimulation in die Ko-Kultur konnte aber durch intensives Waschen der Keratinozyten nach der Stimulation ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur  $IFN-\gamma$  Sekretion wurde die Freisetzung des Zytokins IL-4 und des regulatorischen Zytokins IL-10 in allen Proliferations-gehemmten Nickel-spezifischen T-Zellklonen durch autologe Keratinozyten signifikant blockiert. Interessanterweise waren  $IFN-\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten zu einer stärkeren Hemmung befähigt. Für IL-4 war dieser Effekt signifikant ( $p=0,0075$ ), für IL-10 war eine Tendenz zu erkennen ( $p=0,0521$ ). IL-10 stellte im Rahmen der untersuchten Zytokine in der Gruppe der Proliferations-gehemmten Nickel-spezifischen T-Zellklonen das am stärksten durch Keratinozyten gehemmte Zytokin dar.

### 5.3.1.2 Proliferations-induzierte Nickel-spezifische T-Zellklone

Etwa ein Viertel der in die Ko-Kultur eingesetzten Nickel-spezifischen T-Zellklone (16%) wurde in ihrer Allergen-spezifischen Proliferation durch die Anwesenheit von Keratinozyten induziert. Diese Induktion der Proliferation war signifikant stärker ausgeprägt in der Gegenwart von  $IFN-\gamma$  vorstimulierten Keratinozyten und reichte bei manchen Klonen bis auf 155% des Ausgangswertes (100%).



Welches Merkmal einen Nickel-spezifischen T-Zellklon zu einer Proliferations-gehemmten oder – induzierten T-Zelle werden lässt, konnte nicht identifiziert werden. Die Analyse der Oberflächenmarker CD4 und CD8 zeigte eine gleiche Verteilung innerhalb der beiden Gruppen. Die Analyse des Subtypes der Proliferations-induzierten T-Zellklone lieferte Hinweise auf eine Dominanz von Typ1 Zellen innerhalb dieses Klonkollektives. Die geringe Anzahl von Klonen mit diesem induzierten Phänotyp (fünf Klone) und die Zugehörigkeit eines Tr1 Klones zu dieser Gruppe lässt hier keine verlässlichen Aussagen zu.

Bezüglich des Einflusses von Keratinozyten auf die Zytokinproduktion der Proliferations-induzierten Nickel Klone zeigte sich ein ähnliches Bild, wie für die Proliferations-gehemmten Klone: Das T<sub>H</sub>1 Zytokin IFN- $\gamma$  wies eine uneinheitliche Regulation mit Klonen, die in ihrer Sekretion gehemmt oder induziert wurden. IFN- $\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten konnten die IFN- $\gamma$  Sekretion dieser Klone nicht unterbinden sondern induzierten sie tendentiell.

Unabhängig von der Proliferation wurde wiederum die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 gehemmt. Der Trend einer stärkeren Hemmung durch IFN- $\gamma$  Vorstimulation war ebenfalls zu beobachten. Die Induktion der Proliferation bei gleichzeitiger Hemmung der IL-4 und IL-10 Sekretion ist ein weiterer Hinweis auf die in T-Zellen voneinander unabhängige Regulation der Proliferation und Zytokinproduktion durch Keratinozyten. Auch in der Gruppe der Proliferations-induzierten T-Zellklone war IL-10 das am stärksten durch Keratinozyten gehemmte Zytokin.

### 5.3.1.3 Nickel-spezifische „Selfpresenter“ T-Zellklone

„Selfpresenter“ sind Nickel-spezifische T-Zellen, die zur Induktion einer spezifischen Proliferation auf Nickelsulfat keine professionelle Antigen-präsentierende Zelle benötigen. Vielmehr präsentieren sich diese T-Zellen das Allergen in MHC-abhängiger Weise selbst [120]. Innerhalb des Nickel-spezifischen Klonkollektivs befanden sich acht Klone, die zur Selbstpräsentation von Nickel befähigt waren (sog. „Selfpresenter“). Diese Klone proliferierten sowohl in An- als auch Abwesenheit von APZ spezifisch auf Nickelsulfat. Jedoch lag der Proliferationsindex bei sechs von acht „Selfpresenter“ Klonen in der Gegenwart von APZ höher, bei einem Klon blieb er unverändert. „Selfpresenter“ T-Zellen können somit Nickel als Allergen an andere T-Zellen präsentieren, aber wahrscheinlich nicht mit der Effizienz wie dies professionelle APZ tun.

Auch Nickel-spezifische „Selfpresenter“ Klone unterlagen der Keratinozyten vermittelten Modulation ihrer Proliferation und Zytokinproduktion. Analog zu den Beobachtungen im Nickel-spezifischen Klonkollektiv, wiesen 75% der „Selfpresenter“ Klone (sechs Klone) eine Hemmung der Proliferation auf. Diese Hemmung war interessanterweise in der Abwesenheit von APZ signifikant stärker ausgeprägt.

Eine Proliferationsinduktion konnte bei einem „Selfpresenter“ Klon beobachtet werden - dies sowohl in An- als auch Abwesenheit von APZ.

Während sieben „Selfpresenter“ Klone in An- bzw. Abwesenheit von APZ konform mit einer Hemmung oder Induktion der Proliferation reagierten, zeigte sich bei Klon 2Ni-8.2 (T<sub>C</sub>1 Subtyp) ein anderes Verhalten. Dieser Klon wurde in Anwesenheit von APZ induziert, jedoch in Abwesenheit gehemmt.

Die Modulation des Zytokinprofils von Selfpresenter Klone durch Keratinozyten weist starke Ähnlichkeiten zu der im restlichen Nickel-spezifischen Klonkollektiv auf. IFN- $\gamma$  wurde uneinheitlich reguliert, wohingegen Keratinozyten die Expression der Zytokine IL-4 und IL-10 in allen Klonen unterdrückten. Auch die Hemmung der Zytokinproduktion war in der Abwesenheit von APZ stärker ausgeprägt. Die Beobachtung der stärker hemmenden Kapazität IFN- $\gamma$  vorstimulierter Keratinozyten traf auch auf „Selfpresenter“ Klone zu. IL-10 war sowohl in Ansätzen mit als auch ohne APZ das am meisten regulierte Zytokin.

### 5.3.2 Keratinozyten modulieren die Effektorfunktionen von Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen

Untersuchungen im *in vitro* Modell des atopischen Ekzems konnten mit 8 Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse des *in vitro* Modells der allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel zeigten, dass kein Unterschied zwischen autologen und heterologen Keratinozyten bezüglich ihrer modulierenden Kapazität auf die Effektorfunktionen von T-Zellklonen bestand. Daher wurden in das *in vitro* Modell des atopischen Ekzems zur Vereinfachung hauptsächlich heterologe Keratinozyten eingesetzt. Die heterologen Keratinozyten stammten u.a. von einem Hautgesunden Pollen Allergiker, zwei Nickel-sensibilisierten Spendern, davon einem Spender mit einer Mono-Sensibilisierung gegen Birke, und einem Probanden mit atopischem Ekzem. Um zu zeigen, dass auch im *in vitro* Modell des atopischen Ekzems kein Unterschied zwischen

autologen und heterologen Keratinozyten besteht, wurde der Klon 2p1-4.5 sowohl mit autologen als auch heterologen Keratinozyten kokultiviert.

In der Ko-Kultur zeigten alle Keratinozyten dieselbe modulierende Wirkung auf die T-Zell Proliferation und Zytokinproduktion. Somit bestand interessanterweise hinsichtlich der Modulation der Effektorfunktionen kein Unterschied zwischen „atopischen“ und „nicht-atopischen“ Keratinozyten, die, wie in der Einleitung angeführt, auf externe Stimuli unterschiedlich reagieren. Diese Ergebnisse lieferte einen Hinweis auf eine Spender- und möglicherweise MHC-TZR unabhängige Modulation der T-Zell Effektorfunktion.

Vergleichbar zu den Befunden im Modell der Kontaktreaktion wurden 75% der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone in der Anwesenheit von Keratinozyten in der Allergen-spezifischen Proliferation gehemmt, 25% der Phl p 1-spezifischen Klone wurden induziert. Dieser Effekt war jeweils durch IFN- $\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten signifikant stärker ausgeprägt ( $p=0,0333$  bzw.  $p=0,0005$ ). Auch innerhalb der Phl p 1-spezifischen T-Zellklone konnte kein einheitliches Merkmal bestimmt werden, das einen Klon zu einem Proliferations-gehemmten oder -induzierten Klon werden lässt. Im Vergleich zu den Nickel-spezifischen T-Zellklonen konnte bei Phl p 1-spezifischen Proliferations-induzierten T-Zellklonen keine Dominanz von Typ1 Zellen identifiziert werden.

Einen wichtigen Unterschied in der modulierenden Kapazität von Keratinozyten im Vergleich zum *in vitro* Modell der Kontaktreaktion stellt die Beeinflussung der IFN- $\gamma$  Sekretion in Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen dar. Während dieses Zytokin innerhalb der Nickel-spezifischen T-Zellklone uneinheitlich reguliert wurde, zeigten alle Phl p 1-spezifischen T-Zellklone eine signifikante Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion. Diese IFN- $\gamma$  induzierten Klone setzten sich aus drei T<sub>H1</sub> Klonen und einem T<sub>H2</sub> Klon zusammen. Interessanterweise wurde die IFN- $\gamma$  Produktion in diesem T<sub>H2</sub> Klon am meisten und bis auf das 5,4 fache gesteigert. Zudem konnten Keratinozyten von Nickel-sensibilisierten Spendern, die die IFN- $\gamma$  Produktion in Nickel-spezifischen T-Zellklonen hemmten, diese bei Phl p 1-spezifischen Klonen nicht hemmen, sondern induzierten sie ebenfalls. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich Phl p 1-spezifische T-Zellklone der anti-inflammatorischen Wirkung von Keratinozyten entziehen können.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Nickel-spezifischen Klone wiesen alle Phl p 1-spezifischen T-Zellklone eine signifikante Hemmung ihrer IL-4 und IL-10 Produktion auf.

Auch hier hemmten inflammatorische Keratinozyten die Zytokinproduktion tendentiell stärker. Jedoch stellt im Phl p 1-spezifischen Klonkollektiv nicht IL-10 sondern IL-4 das am stärksten beeinflusste Zytokin dar.

### 5.3.3 Bedeutung der Modulation von T-Zell Effektorfunktionen durch Keratinozyten im allergischen Ekzem

#### 5.3.3.1 Rolle der gehemmten bzw. induzierten T-Zell Proliferation

Die Hemmung der Allergen-spezifischen T-Zell Proliferation durch Keratinozyten ist sowohl im *in vitro* Modell der allergischen Kontaktdermatitis als auch im Modell des atopischen Ekzems der dominierende Effekt. Mit der Hemmung der Proliferation geht zudem eine Hemmung der Produktion des  $T_H2$  Zytokins IL-4 und des regulatorischen Zytokins IL-10 einher. Keratinozyten können somit in der Epidermis ein Mikromilieu generieren innerhalb dessen infiltrierende T-Zellen zwar überleben [184], aber in ihren Effektorfunktionen stark eingeschränkt werden. Dieser ‚Sicherheitsmechanismus‘ könnte einerseits überschießende Immunreaktionen verhindern und andererseits einen Beitrag zur Limitierung der Reaktion leisten bzw. einen Status quo aufrecht erhalten.

In etwa einem viertel der untersuchten Nickel- und Phl p 1-spezifischen T-Zellklone wurde die Allergen-spezifische Proliferation in der Anwesenheit von Keratinozyten induziert. Diese induzierte Proliferation ging jedoch nicht generell mit einer vermehrten Zytokinproduktion einher. Alle Klone wurden durch Keratinozyten in ihrer IL-4 und IL-10 Sekretion gehemmt. Die Proliferations-induzierten, die auch in ihrer IFN- $\gamma$  Freisetzung stimuliert wurden (s. nächster Abschnitt) könnten eine Rolle bei der Chronifizierung der Ekzempläsion haben.

#### 5.3.3.2 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IFN- $\gamma$ Modulation in T-Zellen

Das  $T_H1$  Zytokin IFN- $\gamma$  ist einer der potentesten T-Zellfaktoren, der Keratinozyten zur Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Oberflächenmolekülen aktiviert und so eine bestehende Ekzemreaktion effektiv unterhalten kann.

---

In unserem inflammatorischen Ekzemmodell zeigte sich, dass die IFN- $\gamma$  Sekretion in Nickel-spezifischen T-Zellen durch Keratinozyten gehemmt wird. Durch Wegfall der proinflammatorischen Wirkung von IFN- $\gamma$  in Zusammenwirken mit der Hemmung der IL-4 Sekretion in T-Zellen könnte das von Keratinozyten generierte Mikromilieu zur Abheilung der Typ1 dominierten Läsion beitragen.

Im atopischen Ekzem hingegen kommt es zu einer Induktion der IFN- $\gamma$  Sekretion in Phl p 1-spezifischen T-Zellen. Die Ursache für diese Induktion ist wohl in den T-Zellen, die nicht auf anti-inflammatorische Signale von Keratinozyten reagieren, zu suchen und nicht in den Keratinozyten selbst da Keratinozyten, die im Modell der Kontaktdermatitis die IFN- $\gamma$  Produktion in Nickel-spezifischen T-Zellklonen inhibierten hierzu bei Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen nicht in der Lage waren. Die vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  könnte im atopischen Ekzem einen Beitrag zur weiteren Rekrutierung von Effektorzellen in die Haut und somit zur Amplifizierung der Entzündungsreaktion leisten und an der Umkehr der initial  $T_H2$  geprägten Immunantwort zur chronischen  $T_H1$  Antwort beteiligt sein [55].

#### 5.3.3.3 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IL-4 Modulation in T-Zellen

Dem  $T_H2$  Zytokin IL-4 konnte u.a. in einer Arbeit von Traidl et al. eine proinflammatorische Rolle in der Kontaktreaktion zugeschrieben werden [182]. Zudem regt IL-4 in Zusammenwirken mit IFN- $\gamma$  Keratinozyten zur Produktion der  $T_H1$  Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 an und kann so zur vermehrten Infiltration von  $T_H1$  Zellen in die Haut beitragen [9].

Die Hemmung der IL-4 Produktion durch Keratinozyten war sowohl in Nickel- als auch Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen zu beobachten und im Modell der allergischen Kontaktdermatitis durch inflammatorische Keratinozyten signifikant stärker ausgeprägt ( $p=0,0075$ ). Der Wegfall der proinflammatorischen Wirkung von IL-4 im normalen und auch entzündlichen Mikromilieu der Haut bei gleichzeitiger Unterdrückung der IFN- $\gamma$  Sekretion könnte in der allergischen Kontaktdermatitis und im atopischen Ekzem die weitere Rekrutierung von  $T_H1$  Zellen in die Läsion aufhalten [9] und somit zur Limitierung der Reaktion beitragen.

Die Effektorphase des atopischen Ekzems wird, im Gegensatz zur allergischen Kontaktdermatitis, als biphasisch beschrieben [54, 179], die in der initialen Phase  $T_H2$  vermittelt und im weiteren Verlauf in eine  $T_H1$ -dominierte Reaktion übergeht. Eine Beteiligung verschiedener Zellpopulationen wird als Ursache für diese Umkehr diskutiert; zu

nennen sind hier v.a. aktivierte eosinophile Granulozyten, Makrophagen und IDEC, die über die Sekretion von IL-12 und IL-18 die Differenzierung von naïven T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1 lenken können [69, 125]. Die Umkehr der T<sub>H</sub>2 in eine T<sub>H</sub>1 Antwort findet im Pollen-Patch Test als Modell für das akute atopische Ekzem jedoch bereits 48-72 Stunden nach Allergenkontakt statt [54]. Da die Differenzierung naïver T-Zellen jedoch etwa sieben Tage in Anspruch nimmt [91], scheinen IL-12 und IL-18 nicht für die beschriebene Änderung des Zytokinprofils verantwortlich zu sein.

Die Terminierung der initialen T<sub>H</sub>2 Antwort im atopischen Ekzem könnte durch die in dieser Arbeit ermittelte Hemmung der T<sub>H</sub>2 Effektorfunktionen - Proliferation und IL-4 Produktion - im Mikromilieu der Haut erklärt werden. Zudem wird in Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen die IFN- $\gamma$  Produktion durch Keratinozyten erhöht, was, wie oben beschrieben, einerseits zur Erhaltung der Ekzemreaktion leiten kann; andererseits führt dies nach Terminierung der initialen T<sub>H</sub>2 Reaktion zur Dominanz einer fortschreitenden T<sub>H</sub>1 vermittelten Immunreaktion. Keratinozyten können so über die Modulation der T-Zell Effektorfunktionen den biphasischen Verlauf des atopischen Ekzems mit bedingen. Die Induktion eines T<sub>H</sub>1 Phänotyps in einem ursprünglichen T<sub>H</sub>2 T-Zellklon lässt Freiraum für Spekulationen, ob Keratinozyten nicht nur die Effektorfunktionen von T-Zell Subtypen (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, Tr1) hemmen, sondern auch in der Lage sind den Phänotyp einer T-Zelle hin zu einem anderen Phänotyp zu modulieren.

#### 5.3.3.4 Bedeutung der Keratinozyten vermittelten IL-10 Modulation in T-Zellen

Dem regulatorisch wirksamen Zytokin IL-10 wird klar eine anti-inflammatorische Rolle im immunologischen Geschehen zugeschrieben. IL-10 kann die Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen blockieren und somit deren Ansammlung im Entzündungsgebiet verhindern [4]. Außerdem reagieren APZ auf IL-10 mit einer Herunterregulation von MHC- und Ko-stimulatorischen Molekülen und somit einer verminderten Antigenpräsentation [32].

Interessanterweise zeigten alle isolierten Nickel- und Phl p 1-spezifischen T-Zellklone in der Anwesenheit von Keratinozyten eine Hemmung der IL-10 Sekretion, die ebenfalls tendentiell stärker ausgeprägt war durch inflammatorische Keratinozyten. Diesem Ergebnis zu folge stellt sich die Frage ob IL-10 in der allergischen Ekzem Reaktion nicht das die Entzündung terminierende Zytokin ist. Die IL-10 Hemmung der in die Haut infiltrierenden T-Zellen könnte jedoch zu indirekten anti-inflammatorischen Effekten führen. Durch Aufhebung der IL-10 induzierten Migrations-Blockade [4] könnte es z.B. zur Infiltration weiterer

regulatorischer T-Zell Subpopulationen ins Entzündungsgebiet kommen. Über regulatorische Zell-Kontakte (Tregs) oder TGF- $\beta$  Sekretion ( $T_H3$ ) könnten diese T-Zellen dann zur Limitierung der Reaktion führen. Das Vorhandensein von TGF- $\beta$  in der Ko-Kultur wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Hier konnte jedoch kein TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: 125 pg/ml) lieferte jedoch keine Ergebnisse. Die gezielte Isolierung von  $T_H3$  Zellen und deren Einsatz in Ko-Kultur Experimente könnte hier weitere Einblicke liefern. Möglicherweise wird durch ein IL-10 armes Mikromilieu auch die Apoptose in T-Zellen gefördert, da einerseits der Apoptose protektive Effekt von IL-10 in T-Zellen entfällt [41] und andererseits Keratinozyten das Apoptose-induzierenden Molekül FasL vermehrt exprimieren [15].

Aber nicht nur Zellen mit regulatorischer Aktivität können die Ekzemreaktion terminieren. Wie wir zeigen konnten, können die in der Epidermis ansässigen Keratinozyten ein anti-inflammatorisches Mikromilieu generieren, das Effektorfunktionen von T-Zellen aktiv moduliert und durch deren Hemmung einen Beitrag zur Limitierung der Entzündung leistet.

### 5.3.3.5 Rolle der Modulation von Nickel-spezifischen „Selfpresenter“ T-Zellen in der allergischen Kontaktdermatitis

Nickel-spezifische „Selfpresenter“ stellen eine besondere Untergruppe innerhalb der Nickel-spezifischen T-Zellen dar. Aufgrund der Tatsache, dass diese T-Zellen keiner Allergenpräsentation durch professionelle APZ bedürfen, könnten „Selfpresenter“, durch die proinflammatorische Wirkung von Nickelsulfat induziert, in einer frühen Phase der allergischen Kontaktreaktion in die Haut infiltrieren und noch vor der Migration von APZ und APZ-abhängigen T-Zellen eine Entzündungsreaktion initiieren. Diejenigen „Selfpresenter“, die durch Keratinozyten zu einer vermehrten Proliferation und IFN- $\gamma$  Sekretion angeregt werden, könnten tatsächlich einen Anteil an der Initiierung und Amplifizierung der Kontaktreaktion haben. Die Ausübung der Effektorfunktionen wird jedoch in den meisten „Selfpresentern“ durch Keratinozyten effektiv unterdrückt. Diese frühe Phase der Entzündung könnte somit durch die Aktionen von Keratinozyten in Schach gehalten werden, aber schließlich durch die Infiltration APZ-abhängiger Nickel-spezifischer Effektorzellen fortgeführt werden.

## 5.4 Mechanismen der Modulation von T-Zell Effektorfunktionen durch Keratinozyten

Keratinozyten modulieren sowohl die Allergen-spezifische Proliferation als auch die Zytokinproduktion von T-Zellen. Durch Variation der Ko-Kultur Experimente auf der Ebene der Keratinozyten sollte die Frage nach dem Mechanismus dieser Modulation näher untersucht werden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit von Nickelsulfat gegenüber nativem Phl p 1 und dem auftretenden Spezifitätsverlust Phl p 1-spezifischer T-Zellklone nach mehreren Reaktivierungszyklen wurden alle Experimente zur Klärung des Mechanismus mit Nickel-spezifischen T-Zellklonen durchgeführt.

In der Ko-Kultur befinden sich neben T-Zellen und Keratinozyten auch APZ zur Allergenpräsentation. Keratinozyten könnten durch Beeinflussung von APZ und daraus resultierender verminderter Allergen-Präsentation und verminderter T-Zell Proliferation bzw. Zytokinproduktion über einen indirekten Mechanismus die Effektorfunktionen von T-Zellen modulieren. Diese Möglichkeit konnte durch Ko-Kultur Experimente mit verschiedenen APZ ausgeschlossen werden. Sowohl in Anwesenheit von DZ als auch von EBV-transformierten B-Zellen waren Keratinozyten zur Modulation der T-Zell Effektorfunktion fähig. Auch APZ-unabhängige „Selfpresenter“ T-Zellen wurden in der Abwesenheit von professionellen APZ durch Keratinozyten moduliert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Keratinozyten die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellklone nicht indirekt über die APZ beeinflussen.

Keratinozyten liegen in der Epidermis in unterschiedlichen graduellen Differenzierungsstadien vor – von undifferenzierten, kernhaltigen Basalzellen differenzieren Keratinozyten über das Stratum spinosum und Stratum granulosum hin zu teilungsunfähigen, kernlosen, keratinhaltigen Zellen des Stratum corneums. Diese Differenzierung wurde *in vitro* durch die Zugabe von Kalziumchlorid in das Kulturmedium imitiert [192]. In Ko-Kultur Experimenten zeigte sich, dass Keratinozyten unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad zur Hemmung der Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen fähig waren. Mit Ausnahme der Keratinozyten des Stratum corneums, die nicht mehr in der Lage sind modulierende Botenstoffe neu zu synthetisieren, könnte demnach jede Differenzierungsstufe



und somit jede Schicht der Epidermis die in die Haut infiltrierenden T-Zellen regulieren. Dies spricht für einen sicheren Regulationsmechanismus, der T-Zellvermittelte Immunreaktionen in der Haut stark beeinflussen kann bzw. ein „steady state“ in der Haut aufrecht erhalten kann.

Unter inflammatorischen Bedingungen z.B. dem Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-4 regulieren Keratinozyten die Neusynthese des MHC-Klasse II- und die Synthese des konstitutiv exprimierten MHC-Klasse I Moleküls hoch [191]. Die Rolle dieser Moleküle in der Allergenpräsentation von Keratinozyt an T-Zelle ist bislang umstritten [19, 56]. Traidl et al. konnten zeigen, dass die Induktion von Apoptose in Keratinozyten durch Nickel-spezifische T-Zellen abhängig von der Interaktion zwischen MHC-Molekül und TZR ist [183]. In der vorliegenden Arbeit wurde der mögliche Einfluss von MHC-abhängigen oder Spender-abhängigen Mechanismen in der Modulation von T-Zellen durch Keratinozyten durch die Ko-Kultur mit heterologen im Vergleich zu autologen Keratinozyten bestimmt. Heterologe Keratinozyten von zwei weiteren Nickel-sensibilisierten Spendern konnten die Effektorfunktion von Nickel-spezifischen T-Zellen in identischer Weise wie autologe Keratinozyten hemmen. Da jedoch keine HLA-Expressions Analyse der autologen und heterologen Keratinozyten Spender durchgeführt wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt die Notwendigkeit der MHC/TZR Interaktion nicht vollständig ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund des in Population stark variierenden Spender-spezifischen Expressionsprofils unwahrscheinlich zu sein. Eine unspezifische Wechselwirkung beider Zellen über Integrine oder Selektine konnte zudem durch diese Experimente nicht ausgeschlossen werden.

Zur Klärung ob die T-Zell Modulation über unspezifische Bindung von Oberflächenmolekülen Zell-Kontakt abhängig ist oder auf der Sezernierung von löslichen Faktoren beruht, wurden Keratinozyten mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Fixierung der Keratinozyten immobilisiert die Zellen und verhindert ein Ausschleusen von gespeicherten und neusynthetisierten Faktoren, wobei die Vitalität erhalten bleibt. PFA-fixierte Keratinozyten waren in der Ko-Kultur mit Nickel-spezifischen T-Zellklonen nicht mehr in der Lage, die Proliferation oder Zytokinproduktion zu beeinflussen. Dies legt die Sezernierung eines löslichen Faktors als Mediator der T-Zell Effektorfunktionen nahe. Jedoch konnte die Veränderung von Oberflächenstrukturen durch die Fixierung und der damit verbundene Verlust der modulierenden Eigenschaft in diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden.

Einen weiteren Hinweis auf die Sekretion eines löslichen Faktors durch Keratinozyten lieferten weiterführende Experimente, in denen zellfreie Überstände von Keratinozytenkulturen anstelle von Keratinozyten in die Ko-Kultur eingebracht wurden. Diese Überstände waren in der Lage die Zytokinproduktion der Nickel-spezifischen T-Zellen zu unterbinden. Dieser Effekt war Dosis-abhängig und konnte sowohl mit Überständen aus ruhenden als auch IFN- $\gamma$  vorstimulierten Keratinozytenkulturen erzielt werden. Die durchgehend beobachtete Induktion der Proliferation konnte auf Bestandteile der Keratinozytenmediums zurückgeführt werden.

Um die Sekretion eines löslichen Faktors durch Keratinozyten weiter zu verifizierung, wurden Keratinozyten und T-Zellen mittels einer Transwell-Kammer innerhalb der Ko-Kultur voneinander separiert. Dieser Ansatz wurde in der Literatur beschrieben, um Effekte löslicher, von T-Zellen sezernierter Mediatoren auf Keratinozyten zu untersuchen [122]. Keratinozyten, die im Transwell-Einsatz ko-kultiviert wurden, waren in gleichem Maße in der Lage die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen zu hemmen, wie Keratinozyten, die die Möglichkeit zum Zell-Zell Kontakt hatten. Über den Transwell Einsatz ist zwar der direkte Zellkontakt unterbunden, jedoch kann durch Poren ein Austausch von Molekülen stattfinden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Keratinozyten einen oder mehrere lösliche Faktoren sezernieren, die zur Modulation der T-Zell Proliferation und Zytokinproduktion leiten. Ko-Kultur Experimente zeigen, dass Proliferation und Zytokine unabhängig voneinander reguliert werden. Dies legt eine Produktion mindestens zwei verschiedener Faktoren nahe. Die Induktion von IFN- $\gamma$  bei gleichzeitiger Hemmung der IL-4 und IL-10 Sekretion impliziert das Vorhandensein eines weiteren Mediators. Mögliche von Keratinozyten sezernierte lösliche Modulatoren werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### **5.5 Mögliche Mediatoren zur Modulation von T-Zell Effektorfunktionen**

Der Keratinozyt stellt eine wichtige Schnittstelle in der Kommunikation des Organismus mit seiner Umwelt dar (Abb. 35); er nimmt Signale aus seiner Umwelt auf und wandelt diese in für das Immunsystem verständliche Mediatoren um. So sind Keratinozyten aktiv über die Sekretion von Defensinen an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt und können durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine eine Immunantwort in der

Haut initiieren [73, 163]. Im Vorfeld einer Entzündungsreaktion haben Keratinozyten einen Anteil an der Direktion der Immunantwort in eine bestimmte Richtung, indem sie, abhängig vom eindringenden Allergen, Zytokine sezernieren, die eine Immunantwort entweder in eine  $T_H1$ - oder  $T_H2$ - dominierte Richtung lenken [118, 138, 204]. Durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle können Keratinozyten auch in direktem Zell-Zell Kontakt mit infiltrierenden Zellen kommunizieren und deren Funktionen beeinflussen. Eine anti-inflammatorische Rolle kommt Keratinozyten zudem bei der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in die Haut und somit einer Terminierung der Entzündungsreaktion zu [165]. Diese Vielfalt an bisher beschriebenen Mechanismen, über die Keratinozyten modulierend in die Immunreaktion eingreifen können, lassen Keratinozyten zum Dreh- und Angel-Punkt in der ekzematösen Reaktion werden.

Eine direkte Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Zellen, die in einer veränderten Effektorfunktion der T-Zellen resultiert, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Daher verbleibt die unten geführte Diskussion über die Identität des oder der löslichen Faktoren rein spekulativ und muss in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

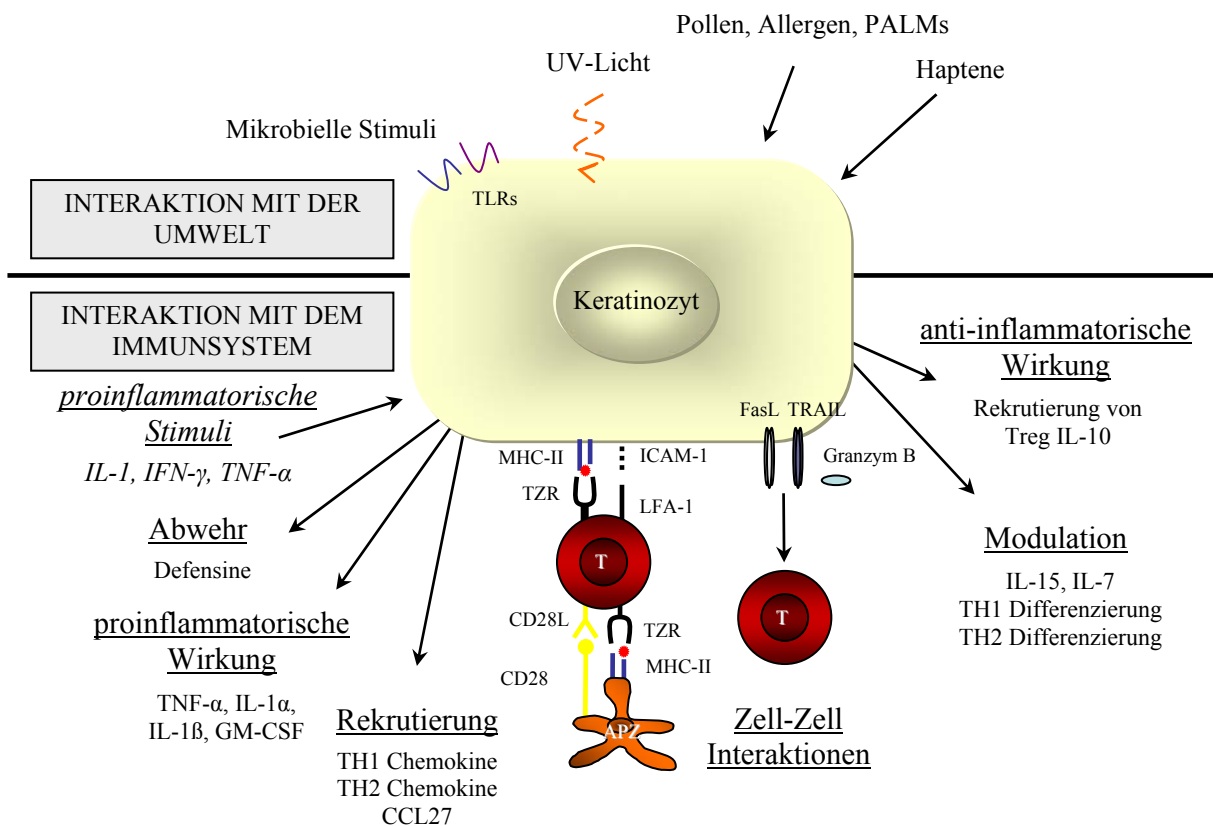


Abb. 35: Die Interaktion von Keratinozyten mit der Umwelt und dem Immunsystem

### 5.5.1 Keratinozyten–Mediatoren, die die T-Zell Proliferation beeinflussen

Nach Literatur Recherche konnten keine löslichen Faktoren identifiziert werden, die von Keratinozyten sezerniert werden und einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen haben. Die nachfolgende Beschreibung der Anergie- und Apoptose Induktion in T-Zellen erklärt somit nicht die in dieser Arbeit beschriebenen über lösliche Faktoren vermittelte Modulation der Proliferation und Zytokinproduktion. Sie könnten jedoch in der lichtmikroskopisch beobachteten engen Interaktion von Keratinozyten und T-Zellen eine Rolle spielen.

Innerhalb einer Immunreaktion werden Keratinozyten durch das von T-Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  zur vermehrten *de novo* Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und MHC-Klasse II angeregt. Jedoch bleibt die Fähigkeit des Keratinozyten zur Allergenpräsentation bislang unklar. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass Keratinozyten das kostimulierende Moleküle CD80 exprimieren [168], aber dessen Wirkung auf T-Zellen ist bisher nicht verstanden. Einige Arbeiten weisen auf eine Anergie-Induktion in T-Zellen hin [19, 60], andere weisen Keratinozyten eine Rolle bei der Induktion der T-Zellproliferation zu [56, 61]. Somit könnte aus dem bisherigen Kenntnisstand sowohl die Hemmung der Proliferation durch unzureichende Kostimulation als auch die Induktion der Proliferation durch die Interaktion zwischen CD80 und CD28 der in dieser Arbeit untersuchten T-Zellklonen erklärt werden. Ob T-Zell-Anergie oder -Apoptose bei der Hemmung der Proliferation durch Keratinozyten eine Rolle spielen, sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Dies könnte z.B. mit inhibierenden Antikörpern gegen die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD28 und gegen das HLA-DR Molekül durchgeführt werden.

Die Induktion von Apoptose in T-Zellen durch Keratinozyten könnte ein weiterer Erklärungsansatz zur Hemmung der T-Zellproliferation sein. Keratinozyten exprimieren Apoptose-induzierende Moleküle, wie u.a. „tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand“, TRAIL, und FasL, deren jeweilige Rezeptoren, TRAILR1-R4 und Fas, auf T-Zellen vorhanden sind [15, 142]. Eidsmo et al. berichteten, dass Keratinozyten zudem lösliches TRAIL sezernieren [52], das in Zell-Kontakt unabhängiger Weise zur Induktion von Apoptose befähigt ist.

Ein weiterer Mechanismus der Proliferationshemmung könnte der Entzug von für T-Zellen notwendige Wachstumsfaktoren durch Keratinozyten in der Ko-Kultur sein. Diese Möglichkeit konnte jedoch durch Experimente mit zellfreien Überständen von Keratinozytenkulturen ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von Keratinozyten-Überständen konnten zudem sterische Effekte, die eine Interaktion zwischen T-Zellklon und APZ verhindern und somit zur reduzierten Proliferation führen, ausgeschlossen werden.

Die Allergen-spezifische Induktion der Proliferation tritt in einer Subgruppe von T-Zellklonen auf und kann ebenfalls durch verschiedene Ansätze erklärt werden. Keratinozyten sezernieren T-Zell-trophe Zytokine, die das Wachstum von Effektor T-Zellen in der Abwesenheit von MHC- und kostimulatorischen Molekülen fördern können [2, 81].

Hierzu zählen u.a. IL-7 und IL-15, die über Bindung an den IL-7 bzw. IL-15 Rezeptor die T-Zellproliferation stimulieren [63]. IL-15 wird im Gegensatz zu IL-7 ausschließlich unter inflammatorischen Bedingungen in Keratinozyten induziert und spielt somit eher eine Rolle in bereits bestehenden Immunreaktionen [78]. Die Tatsache der stärkeren Proliferationsinduktion durch IFN- $\gamma$  vorstimulierte Keratinozyten macht eine Rolle von IL-15 in diesem Prozess wahrscheinlich. IL-7 und IL-15 schützen zudem T-Zellen vor Fas-induzierter Apoptose, jedoch ist hier das Verhältnis zwischen IL-2 und IL-7 bzw. IL-15 entscheidend, da ein Übergewicht an IL-2 Apoptose-fördernd wirkt [90, 108].

Ergebnisse aus dem Mausmodell deuten auf eine wichtige Rolle von IL-18 in der Pathogenese der Ekzemreaktion hin, da eine Blockade des u.a. von Keratinozyten sezernierten Zytokins zu einer Unterbindung der allergischen Kontaktreaktion führte [100, 140]. Humane T-Zellen exprimieren den IL-18 Rezeptor und es konnte kürzlich gezeigt werden, dass IL-18 die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördert und sie zugleich vor Apoptose schützt [27, 107].

#### 5.5.1 Keratinozyten – Mediatoren, die die T-Zell Zytokinproduktion beeinflussen

Die Suche nach Faktoren, die die Hemmung bzw. Induktion von IFN- $\gamma$  und die IL-4 und IL-10 Hemmung in T-Zellen durch Keratinozyten erklären könnte, lieferte nur bezüglich der Modulation des T<sub>H</sub>1 Zytokins Ergebnisse:

Die Gruppe der IFN- $\gamma$  induzierenden Zytokine, IL-12, IL15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27 stellen Kandidaten zur Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion in T-Zellen dar, jedoch bewirken IL-12 und IL-27 lediglich die Differenzierung naiver T-Zellen zu IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 Zellen [131]; ein

direkter Einfluss von IL-12 und IL-27 auf die IFN- $\gamma$  Produktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Interessant scheint das von Keratinozyten sezernierte Zytokin IL-18 zu sein, dessen Blockade im Mausmodell zu einer Unterbindung der allergischen Kontaktreaktion führte [100, 140]. T-Zellen exprimieren den IL-18 Rezeptor; IL-18 kann entweder alleine oder in Synergie mit IL-15 oder IL-21 in verstärkter Form IFN- $\gamma$  in T-Zellen induzieren [27, 107].

IL-15 ist ein weiteres Keratinozyten-Zytokin, das als T-Zell Wachstumsfaktor beschrieben ist, und alleine oder in Kombination mit dem von aktivierten T-Zellen sezernierten IL-21 die IFN- $\gamma$  Produktion der T-Zellen erhöhen kann.

Ein weiteres Zytokin aus der Gruppe der IFN- $\gamma$  induzierenden Zytokine, IL-23, ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten, IL-23 p19 und IL-12 p40, das aufgrund der gemeinsamen p40 Untereinheit strukturell mit dem T<sub>H</sub>1-polarisierenden IL-12 verwandt ist [129]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-23, ähnlich wie IL-18 oder IL-15, ebenfalls ein starker Induktor der IFN- $\gamma$  Expression ist, dies allerdings nur in Effektor T-Zellen. Aufgrund der vermehrten Expression in psoriatischer Haut könnte die Interaktion zwischen Effektor T-Zelle und Keratinozyt eine Rolle bei der Amplifizierung dieser Erkrankung haben [138]. Untersuchungen an atopischen Ekzempläsionen wurden bisher nicht durchgeführt. IL-23 wird zudem als Induktor der IL-17 Produktion in T<sub>H</sub>17 Zellen beschrieben, die durch ihre Effektorfunktionen einen Beitrag zur Entzündungsreaktion in der Haut leisten [7].

Nicht nur Zytokine kommen als Modulatoren der Effektorfunktionen von T-Zellen in Frage; in einer kürzlich erschienen Arbeit konnte der Einfluss von Adenosin auf die Zytokinproduktion von Melanom-spezifischen T-Effektorzellen gezeigt werden [143]. Adenosin ist ein endogenes Adenin Nukleosid, das aus den energieübertragenden Molekülen ATP, ADP oder AMP gebildet wird. Es kann über Membran Nukleosid Transporter in den extrazellulären Raum transportiert werden und scheint eine Rolle beim Schutz des Gewebes vor hypoxischen/ischämischen und Entzündungsschäden zu spielen [44, 169]. Adenosin unterbindet die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und u.a. die Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  [143]. Somit könnte zumindest die Hemmung der IFN- $\gamma$  Produktion innerhalb der Nickel-spezifischen T-Zellklone erklärt werden; jedoch wurde die Existenz des Nukleosid Transporters in Keratinozyten bisher noch nicht untersucht.

Die Spekulation über die Identität der löslichen Faktoren, die Effektorfunktionen von T-Zellen modulieren, wird durch eine Vielfalt von Substanzen, die von Keratinozyten sezerniert werden, genährt. Jedoch konnte an Hand der Literatur kein einzelner Faktor identifiziert werden, der alle modulierten Effekte erklären könnte. In weiteren Experimenten steht daher im Vordergrund Kandidatenfaktoren wie die oben beschriebenen gezielt in der Zellkultur zu inhibieren und somit deren Effekte genauer zu analysieren. Zudem sind Unterschiede innerhalb der gehemmten bzw. induzierten T-Zellklone und Unterschiede zwischen den Nickel- und Phl p 1-spezifischen T-Zellklonen näher zu betrachten, da sie möglicherweise einen Hinweis auf die Substanzgruppe liefern, mittels derer Keratinozyten auf T-Zellen wirken.

## **5.6 Hypothese zur Rolle von Keratinozyten in der Ekzem Reaktion**

### **5.6.1 Rolle von Keratinozyten in der allergischen Kontaktdermatitis**

Bei der allergischen Kontaktdermatitis auf Haptene wie Nickel handelt es sich immunologisch gesehen um eine verzögerte Reaktion vom Typ IV die eine Sensibilisierung gegenüber dem Hapten voraussetzt und erst 24-48 Stunden nach Allergenkontakt beginnt [54]. Klinisch äußert sich die Kontaktreaktion in einer Rötung, Schwellung, Bläschenbildung und Juckreiz. An der Initiierung dieser Reaktion ist das Hapten Nickel maßgeblich beteiligt; Nickel regt Keratinozyten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors, VEGF, an, die zu einer Aktivierung des Endothels, zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und somit zu einer verstärkten Infiltration von CLA<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut führen [73, 74, 132]. Erst wenn durch diese Mechanismen ein kritisches Maß an proinflammatorischen Stimuli erreicht ist, das zur Infiltration von Entzündungszellen führt, kippt die Balance zwischen Regulation und Entzündung in Richtung Entzündung und resultiert in der Eliminierung des eingedrungenen Antigens durch die hervorgerufene Entzündungsreaktion. Schematisch ist dieser Ablauf in Abbildung 36 als schwarzer Graph dargestellt. 24 Stunden nach Nickelkontakt steigt die Linie als Zeichen der beginnenden Entzündung an. Dies geht *in situ* mit einer Infiltration Nickel-spezifischer T-Zellen analog zur steigenden Expression von Chemokinen in der Haut einher. Wenn der Schwellenwert (kritisches Maß proinflammatorischer Stimuli), dargestellt als gestrichelte

---

Linie, überschritten wird, kommt es für den Patienten zur Ausprägung der klinischen Symptomatik (Plateau des Graphen). Diese ist u.a bedingt durch die Wechselwirkungen von ICAM-1/LFA-1 und MHC/TZR die eine enge Interaktion zwischen Keratinozyten und infiltrierten T-Zellen ermöglichen und in der Apoptose der Keratinozyten resultieren, die wiederum mit konsekutiver Auflösung des Zellverbandes und interzellulärem Ödem einhergeht [183].

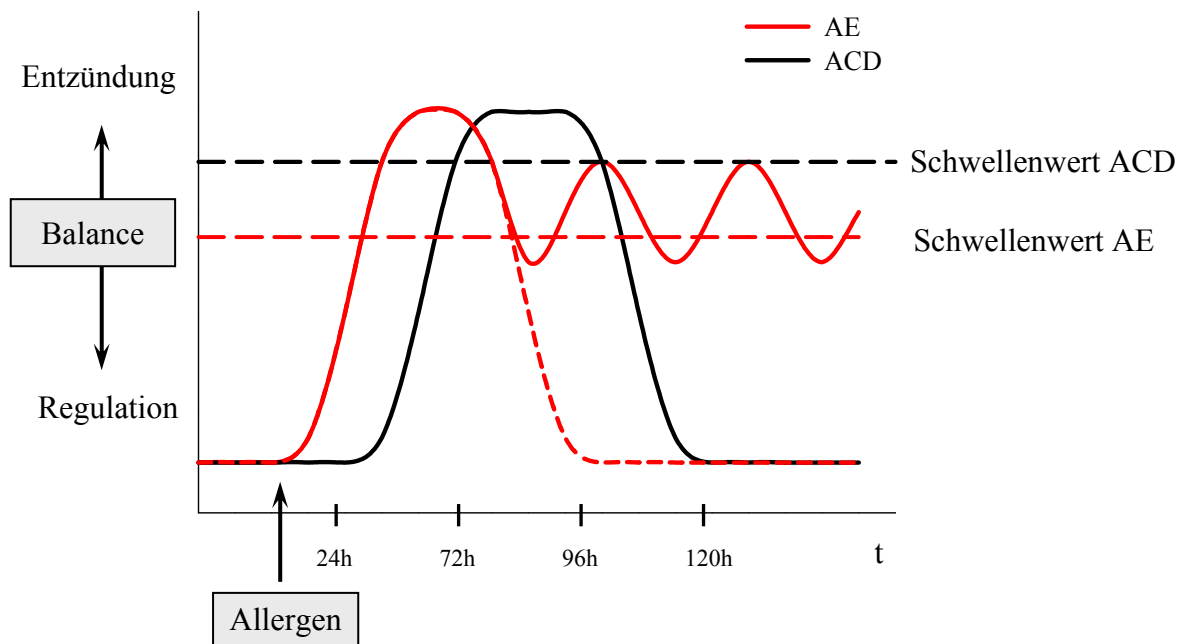
Kontaktreaktionen auf Haptene sind in der Regel selbstlimitierend und klingen innerhalb weniger Tage ohne weiteren Noxenkontakt wieder ab. Dies ist in Abbildung 36 als Abfall des schwarzen Graphen gezeigt. An der Abheilung der Läsion sind mehrere Mechanismen beteiligt; durch Abtransport des Antigens über die Lymphbahn verliert sich über die Zeit der proinflammatorische Einfluss des Haptens auf ortsansässige Zellen. Auch die Infiltration von regulatorischen T-Zellen in die Haut und die durch die Aktivierung induzierte Apoptose von T-Zellen spielen eine Rolle [37, 91]. Keratinozyten selbst sind zudem möglicherweise in der Lage über Fas/FasL bzw. TRAIL/TRAILR Interaktionen und die Sekretion von Perforin und Granzym B Apoptose in T-Zellen zu induzieren und somit einen Beitrag zur Limitierung der Entzündungsreaktion leisten [15, 22, 142]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Keratinozyten in der Haut durch Sekretion löslicher Faktoren ein Mikromilieu generieren das ebenfalls zur Terminierung der Reaktion beitragen kann. Durch Modulation der Proliferation und Zytokinproduktion von Nickel-spezifischen T-Zellen können Keratinozyten aktiv die Effektorfunktionen von  $T_H1$ ,  $T_H2$  und Tr1 Zellen unterbinden. Ob Keratinozyten alleine in der Lage sind, eine Kontaktreaktion zu beenden, ist aus unseren Ergebnissen nicht ersichtlich und auch nicht wahrscheinlich, aber sie könnten durch die oben genannten Mechanismen einen wichtigen Beitrag dazu leisten.

Da auch IL-10-produzierende regulatorische T-Zellen in der Ausübung ihrer Funktion durch lösliche, von Keratinozyten sezernierten Faktoren blockiert werden lässt sich möglicherweise schließen, dass diese Tr1 Zellen in der Kontaktreaktion *in vivo* alleine nicht in der Lage sein dürften, die Entzündungsreaktion zu beenden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen modulierenden Effekte von Keratinozyten auf die Funktion von T-Zellen können möglicherweise auch einen Erklärungsansatz für die verzögerte Kinetik der Kontaktreaktion liefern. Wenn man die Annahme zu Grunde legt, dass Keratinozyten auch im normalen, nicht-inflammatorischen Zustand ein anti-



inflammatorisches Mikromilieu generieren, dann kann eine gewebeschädliche Entzündungsreaktion erst entstehen wenn dieser ‚Sicherheitsmechanismus‘ der Haut überwunden wird. Möglicherweise kann die proinflammatorische Potenz des Allergens Nickel und die damit verbundene Aktivierung ortsansässiger Zellen diese Sicherheitsstufe innerhalb von 24 Stunden überwältigen.



**Abb. 36: Verlauf der Immunreaktion in der allergischen Kontaktdermatitis und des atopischen Ekzems**

Der schwarze bzw. rote Graph stellt den Verlauf der Immunreaktion in der Kontaktreaktion (ACD) bzw. des atopischen Ekzems (AE) in Abhängigkeit von proinflammatorischen Stimuli und des Zeitverlaufes dar. Die gestrichelten Linien geben den Schwellenwert wieder, der zur Auslösung einer Reaktion überschritten werden muss.

### 5.6.1 Rolle von Keratinozyten im atopischen Ekzem

Das atopische Ekzem ist im Vergleich zur Kontaktreaktion gekennzeichnet durch eine frühere Kinetik, die bereits wenige Stunden nach Allergenkontakt durch infiltrierende T-Zellen charakterisiert ist [54]. Die schnelle Reaktion wird möglicherweise durch die Präsenz von FcεRI/IgE positiven DZ/LZ und Mastzellen bewerkstelligt [126], die in einer Sofortreaktion auf eingedrungene Allergene mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren reagieren und

eine Immunreaktion in der Haut effizient induzieren können. Die schematische Darstellung des Verlaufs des atopischen Ekzems ist in Abbildung 36 durch die rote Linie gezeigt. Auch hier kommt es nach Überschreiten eines kritischen Schwellenwertes zur Ausbildung der klinischen Symptomatik. Dieser Schwellenwert ist in Abbildung 36 als rote gestrichelte Linie dargestellt und dürfte niedriger liegen als der Schwellenwert der allergischen Kontaktreaktion. Zu begründen ist dies durch die generell erhöhte Entzündungsneigung der Haut bei Patienten mit atopischem Ekzem, die gekennzeichnet ist durch eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren aus der AP-1 Familie und die erhöhte T-Zellzahl in nicht betroffenen Hautarealen [136].

Im Gegensatz zur allergischen Kontaktdermatitis auf Nickel, liegt im atopischen Ekzem in der frühen Phase der Reaktion ein  $T_H2$  Milieu mit vermehrter Produktion von IL-5 gegenüber IFN- $\gamma$  vor [54]. Der Pollen selbst ist möglicherweise für die Induktion dieses  $T_H2$  Milieus mit verantwortlich; Pollen-assoziierte Lipid Mediatoren (PALMs) bewirken in DZ eine verminderte IL-12 Produktion mit der eine Differenzierung naiver T-Zellen zu  $T_H2$  Zellen verbunden ist [181]. Die Natur des Allergens spielt somit eine entscheidende Rolle in der Initiierung von Immunantworten in der Haut. In der späten Phase der Reaktion hingegen ändert sich das anfängliche  $T_H2$  Milieu in ein  $T_H1$  Milieu, das durch vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  in der Läsion gekennzeichnet ist [54].

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Keratinozyten an diesem Umkehr Prozess aktiv beteiligt sind. Einerseits hemmen sie durch Sekretion löslicher Faktoren die IL-4 Produktion in  $T_H2$  T-Zellen und so die Effektfunktion dieser Zellen, andererseits fördern sie durch die Induktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen die Ausprägung des  $T_H1$  Profils in der chronischen Phase.

Im atopischen Ekzem können, wie auch für die Kontaktdermatitis beschrieben, ebenfalls verschiedene Mechanismen zur Limitierung der Entzündungsreaktion führen. In Abbildung 36 ist dies durch den Abfall der roten fein gestrichelten Linie gezeigt. Häufig kommt es jedoch zur Chronifizierung und zum Persistieren der anfänglichen Entzündungsreaktion, die möglicherweise durch Fehregulationen im Kompartiment der regulatorischen T-Zellen zu erklären ist [130, 190]. Dieses erneute Aufflackern der anfänglichen Entzündungsreaktion ist in Abbildung 36 als Schwankung der roten Linie um den Schwellenwert symbolisiert. Einen weiteren Beitrag zur Chronifizierung liefern psycho-soziale Faktoren, wie Stress, Kratzen, schlechter Immunstatus und Superinfektionen [145]. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Keratinozyten im atopischen Ekzem als weiterer ‚chronifizierender‘ Faktor gewertet werden

können. Keratinozyten induzieren innerhalb der untersuchten Phl p 1-spezifischen T-Zellklone die IFN- $\gamma$  Produktion. IFN- $\gamma$  ist das potenteste Zytokin in der Aktivierung von Keratinozyten und regt diese zur Expression verschiedener Moleküle wie Chemokine, Zytokine und Oberflächenmoleküle an, die zu einer weiteren Amplifikation der Entzündungsreaktion und zur Chronifizierung der Läsion leiten können.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Modulation von T-Zellen durch Keratinozyten im Mikromilieu der Haut entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Ekzemreaktion hat. Spielen in der Frühphase der Ekzemreaktion sowohl die weitgehend genetisch determinierte Bereitschaft zur Entzündung als auch die Natur des Allergens und damit Umweltfaktoren die entscheidende Rolle, so scheinen die Wechselwirkungen der lokalen und eingewanderten Zellen, die in ihrer Gesamtheit als Mikromilieu bezeichnet werden, den weiteren Verlauf der Ekzemreaktion zu bestimmen

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit charakterisiert die Rolle von Keratinozyten in der allergischen Ekzemreaktion. Es ist bekannt, dass Keratinozyten Signale aus der Umwelt in für das Immunsystem verständliche Mediatoren umwandeln und über Oberflächenmoleküle und die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen mit T-Zellen potentiell interagieren können. Die Untersuchung der genauen Natur dieser Interaktionen setzt ein realitätsnahes Zellkultur Modell voraus. Für zwei der häufigsten ekzematösen Erkrankungen, die allergische Kontaktdermatitis (ACD) und das atopische Ekzem (AE), konnten in dieser Arbeit solche autologen *in vitro* Modelle etabliert und angewendet werden.

Die Untersuchung des Einflusses von Keratinozyten auf T-Zell Effektorfunktionen ergab, dass die Allergen-spezifische Proliferation von T-Zellklonen in beiden Modellen mehrheitlich (84% bzw. 75%) durch die Anwesenheit von Keratinozyten gehemmt, in einer Minderheit (16% bzw. 25%) induziert wurde. Die Produktion der Zytokine IL-4 und IL-10 wurde in allen Klonen, unabhängig von der Proliferation, durch Keratinozyten gehemmt. Das  $T_H1$ -Zytokin IFN- $\gamma$  wurde im Modell der ACD uneinheitlich, jedoch zumeist im Sinne einer Hemmung, reguliert; im Modell der AE hingegen zeigte sich eine signifikante Induktion der IFN- $\gamma$  Sekretion in der Gegenwart von Keratinozyten.

Der Mechanismus, mit dem Keratinozyten die T-Zell Effektorfunktionen modulieren, konnte in dieser Arbeit eingegrenzt werden; so waren die modulierenden Eigenschaften von Keratinozyten unabhängig von deren HLA-Profil und Differenzierungsgrad. Die Nivellierung der beobachteten Effekte durch Fixierung der Keratinozyten legen lösliche Faktoren als Mediatoren nahe. Ko-Kultur Experimente mit zell-freien Keratinozyten-Kulturüberständen und die Separation beider Zelltypen mittels eines Zwei-Kammersystems führten ebenfalls zur Modulation der T-zellulären Proliferation und Zytokinproduktion. Die Hypothese der Beteiligung löslicher Faktoren konnte somit bewiesen werden.

In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass Keratinozyten durch Modulation der Effektorfunktionen von T-Zellen aktiv in das immunologische Geschehen während der Ekzemreaktion eingreifen und damit einen Einfluss auf den Ausgang der Immunreaktion in der Haut haben können. Tragen Keratinozyten durch Ausschütten löslicher Faktoren in der allergischen Kontaktdermatitis zu deren Limitierung bei, so könnten sie in der akuten atopischen Ekzempläsion sowohl an der Ausprägung der T<sub>H</sub>1 Dominanz als auch an der möglichen Chronifizierung der Reaktion beteiligt sein.

Diese erstmals beschriebene aktive Modulation von T-Zellen durch Keratinozyten beleuchtet den Verlauf der allergisch ekzematösen Hautreaktion neu, bringt neue Regulatoren ins Spiel (Keratinozyten) und könnte – nach Identifizierung der verantwortlichen Faktoren – auch zur Entwicklung neuartiger Therapiestrategien beitragen.

## 7. Summary

This work characterises the role of keratinocytes in allergic eczematous reactions. Keratinocytes are known to translate signals from the environment into mediators of the immune system and to interact with T cells via surface molecules and the secretion of chemokines and cytokines. A prerequisite for the particular study of these interactions is a realistic cell culture model. For two common eczematous diseases, the allergic contact dermatitis (ACD) and the atopic eczema (AE), such autologous *in vitro* models have been established and exercised in this work.

The investigation of the impact of keratinocytes on T cell effector functions revealed that in both systems the allergen-specific proliferation of T cell clones was inhibited in the presence of keratinocytes in the majority of clones (84% and 75%, respectively) and induced in only a minority of clones (16% and 25%, respectively). Production of the cytokines IL-4 and IL-10 was inhibited by keratinocytes in all clones independently from proliferation. The T<sub>H</sub>1 cytokine IFN- $\gamma$  was modulated irregular but largely in terms of inhibition in the model of ACD; however, in the model of AE T cell clones showed a significant induction of IFN- $\gamma$  in the presence of keratinocytes.

The mechanism how keratinocytes modulate T cell effector functions could be narrowed down in this work; the modulatory capacity was independent from the HLA-profile and differentiation state. The abrogation of the observed effects by fixation of the keratinocytes suggests soluble factors as mediators. Co-culture experiments with cell-free keratinocyte culture-supernatants and separation of both cell types by a Transwell chamber also resulted in modulation of T cell proliferation and cytokine production. The hypothesis of soluble factors could therefore be verified.

This work shows for the first time that keratinocytes are capable to influence actively immunologic events by modulation of T cell effector functions and have an impact on the outcome of cutaneous immune reactions. By secretion of soluble factors keratinocytes may

## SUMMARY

---

contribute to the limitation of allergic contact dermatitis and in acute atopic eczematous lesions may mediate the development of T<sub>H</sub>1 dominance and chronification.

This newly described active modulation of T cells by keratinocytes highlights a new aspect in the course of allergic eczematous reactions, shows new regulators (keratinocytes) and could – after identification of the responsible factors – lead to the development of novel therapeutic strategies.

1. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. 8(9): p. 942-9.
2. Agea, E., A. Russano, O. Bistoni, R. Mannucci, I. Nicoletti, L. Corazzi, A.D. Postle, G. De Libero, S.A. Porcelli, and F. Spinazzi, *Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens*. J Exp Med, 2005. 202(2): p. 295-308.
3. Akdis, C.A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich, and K. Blaser, *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy*. J Clin Invest, 1998. 102(1): p. 98-106.
4. Akdis, C.A., A. Joss, M. Akdis, A. Faith, and K. Blaser, *A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding*. Faseb J, 2000. 14(12): p. 1666-8.
5. Akdis, M., A. Trautmann, S. Klunker, I. Daigle, U.C. Kucuksezer, W. Deglmann, R. Disch, K. Blaser, and C.A. Akdis, *T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells*. Faseb J, 2003. 17(9): p. 1026-35.
6. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C.B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C.A. Akdis, *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(11): p. 1567-75.
7. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1999. 162(1): p. 494-502.
8. Albanesi, C., C. Scarponi, A. Cavani, M. Federici, F. Nasorri, and G. Girolomoni, *Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2000. 115(1): p. 81-7.
9. Albanesi, C., C. Scarponi, S. Sebastiani, A. Cavani, M. Federici, O. De Pita, P. Puddu, and G. Girolomoni, *IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines*. J Immunol, 2000. 165(3): p. 1395-402.
10. Albanesi, C., C. Scarponi, S. Sebastiani, A. Cavani, M. Federici, S. Sozzani, and G. Girolomoni, *A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases*. J Leukoc Biol, 2001. 70(4): p. 617-23.
11. Allam, J.P., E. Klein, T. Bieber, and N. Novak, *Transforming growth factor-beta1 regulates the expression of the high-affinity receptor for IgE on CD34 stem cell-derived CD1a dendritic cells in vitro*. J Invest Dermatol, 2004. 123(4): p. 676-82.
12. Allam, J.P. and N. Novak, *The pathophysiology of atopic eczema*. Clin Exp Dermatol, 2006. 31(1): p. 89-93.
13. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira, *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10*. J Immunol, 2001. 166(5): p. 3008-18.
14. Ansel, K.M., D.U. Lee, and A. Rao, *An epigenetic view of helper T cell differentiation*. Nat Immunol, 2003. 4(7): p. 616-23.



15. Arnold, R., M. Seifert, K. Asadullah, and H.D. Volk, *Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand interaction: modulation by cytokines*. J Immunol, 1999. 162(12): p. 7140-7.
16. Bacon, K., M. Baggiolini, H. Broxmeyer, R. Horuk, I. Lindley, A. Mantovani, K. Maysushima, P. Murphy, H. Nomiyama, J. Oppenheim, A. Rot, T. Schall, M. Tsang, R. Thorpe, J. Van Damme, M. Wadhwa, O. Yoshie, A. Zlotnik, and K. Zoon, *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. 22(10): p. 1067-8.
17. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. 392(6676): p. 565-8.
18. Baker, B.S., *The role of microorganisms in atopic dermatitis*. Clin Exp Immunol, 2006. 144(1): p. 1-9.
19. Bal, V., A. McIndoe, G. Denton, D. Hudson, G. Lombardi, J. Lamb, and R. Lechler, *Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells*. Eur J Immunol, 1990. 20(9): p. 1893-7.
20. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks, *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity*. Nature, 2002. 420(6915): p. 502-7.
21. Bellinghausen, I., B. Klostermann, J. Knop, and J. Saloga, *Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(4): p. 862-8.
22. Berthou, C., L. Michel, A. Soulie, F. Jean-Louis, B. Flageul, L. Dubertret, F. Sigaux, Y. Zhang, and M. Sasportes, *Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense*. J Immunol, 1997. 159(11): p. 5293-300.
23. Berufsgenossenschaft, *Präventionskampagne Haut*, [www.2m2-haut.de](http://www.2m2-haut.de). 2007.
24. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. 441(7090): p. 235-8.
25. Bieber, T., H. de la Salle, A. Wollenberg, J. Hakimi, R. Chizzonite, J. Ring, D. Hanau, and C. de la Salle, *Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI)*. J Exp Med, 1992. 175(5): p. 1285-90.
26. Bigler, C.F., D.A. Norris, W.L. Weston, and W.P. Arend, *Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1992. 98(1): p. 38-44.
27. Bofill, M., E. Almirall, A. McQuaid, R. Pena, R. Ruiz-Hernandez, M. Naranjo, L. Ruiz, B. Clotet, and F.E. Borrás, *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(3): p. 460-5.
28. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J.L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J.P. Revillard, and J.F. Nicolas, *Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene*. Eur J Immunol, 1995. 25(11): p. 3006-10.
29. Braunstein, S., G. Kaplan, A.B. Gottlieb, M. Schwartz, G. Walsh, R.M. Abalos, T.T. Fajardo, L.S. Guido, and J.G. Krueger, *GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 1994. 103(4): p. 601-4.

30. Bromley, S.K., A. Iaboni, S.J. Davis, A. Whitty, J.M. Green, A.S. Shaw, A. Weiss, and M.L. Dustin, *The immunological synapse and CD28-CD80 interactions*. Nat Immunol, 2001. 2(12): p. 1159-66.
31. Budnik, A., M. Grewe, K. Gyufko, and J. Krutmann, *Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells*. Exp Hematol, 1996. 24(2): p. 352-9.
32. Buelens, C., F. Willems, A. Delvaux, G. Pierard, J.P. Delville, T. Velu, and M. Goldman, *Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. 25(9): p. 2668-72.
33. Burns, R., I. Luzina, A. Nasir, C.G. Haidaris, R.K. Barth, and A.A. Gaspari, *Keratinocyte-derived, CD80-mediated costimulation is associated with hapten-specific IgE production during contact hypersensitivity to TH1 haptens*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(2): p. 383-90.
34. Calnan, C.D., *Nickel dermatitis*. Br J Dermatol, 1956. 68(7): p. 229-36.
35. Campbell, J.J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D.P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu, and E.C. Butcher, *The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells*. Nature, 1999. 400(6746): p. 776-80.
36. Cavani, A., D. Mei, E. Guerra, S. Corinti, M. Giani, L. Pirrotta, P. Puddu, and G. Girolomoni, *Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic 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(4): p. 621-8.
37. Cavani, A., F. Nasorri, C. Ottaviani, S. Sebastiani, O. De Pita, and G. Girolomoni, *Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals*. J Immunol, 2003. 171(11): p. 5760-8.
38. Charbonnier, A.S., N. Kohrgruber, E. Kriehuber, G. Stingl, A. Rot, and D. Maurer, *Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells*. J Exp Med, 1999. 190(12): p. 1755-68.
39. Cherwinski, H.M., J.H. Schumacher, K.D. Brown, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies*. J Exp Med, 1987. 166(5): p. 1229-44.
40. Choi, M.J. and H.I. Maibach, *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin*. Am J Clin Dermatol, 2005. 6(4): p. 215-23.
41. Cohen, S.B., J.B. Crawley, M.C. Kahan, M. Feldmann, and B.M. Foxwell, *Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2*. Immunology, 1997. 92(1): p. 1-5.
42. Coombs, R. and P. Gell, *The classification of allergic reactions underlying disease*. In: Clinical aspects of immunology, 1963: p. 317.
43. Cox, H.E., M.F. Moffatt, J.A. Faux, A.J. Walley, R. Coleman, R.C. Trembath, W.O. Cookson, and J.I. Harper, *Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor*. Br J Dermatol, 1998. 138(1): p. 182-7.
44. Cronstein, B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. J Appl Physiol, 1994. 76(1): p. 5-13.

45. Cruz, M.T., M. Goncalo, A. Figueiredo, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, and M.C. Lopes, *Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF-kB and AP-1 and increases the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line*. *Exp Dermatol*, 2004. 13(1): p. 18-26.
46. Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick, *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. *Nature*, 2003. 421(6924): p. 744-8.
47. De Smedt, A.C., R.L. Van Den Heuvel, N. Zwi Berneman, and G.E. Schoeters, *Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+-derived DC by NiCl(2) and SDS*. *Toxicol In Vitro*, 2001. 15(4-5): p. 319-25.
48. Dickel, H., T. Bruckner, C. Bernhard-Klimt, T. Koch, R. Scheidt, and T.L. Diepgen, *Surveillance scheme for occupational skin disease in the Saarland, FRG. First report from BKH-S. Contact Dermatitis*, 2002. 46(4): p. 197-206.
49. Dilulio, N.A., T. Engeman, D. Armstrong, C. Tannenbaum, T.A. Hamilton, and R.L. Fairchild, *Groalpha-mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(11): p. 3485-95.
50. Ding, J., X. Zhang, J. Li, L. Song, W. Ouyang, D. Zhang, C. Xue, M. Costa, J.A. Melendez, and C. Huang, *Nickel compounds render anti-apoptotic effect to human bronchial epithelial Beas-2B cells by induction of cyclooxygenase-2 through an IKKbeta/p65-dependent and IKKalpha- and p50-independent pathway*. *J Biol Chem*, 2006. 281(51): p. 39022-32.
51. Dustin, M.L., K.H. Singer, D.T. Tuck, and T.A. Springer, *Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)*. *J Exp Med*, 1988. 167(4): p. 1323-40.
52. Eidsmo, L., C. Fluur, B. Rethi, S. Eriksson Ygberg, N. Ruffin, A. De Milito, H. Akuffo, and F. Chiodi, *FasL and TRAIL induce epidermal apoptosis and skin ulceration upon exposure to Leishmania major*. *Am J Pathol*, 2007. 170(1): p. 227-39.
53. Emtestam, L., H. Zetterquist, and O. Olerup, *HLA-DR, -DQ and -DP alleles in nickel, chromium, and/or cobalt-sensitive individuals: genomic analysis based on restriction fragment length polymorphisms*. *J Invest Dermatol*, 1993. 100(3): p. 271-4.
54. Eyerich, K., J. Huss-Marp, U. Darsow, A. Wollenberg, S. Foerster, J. Ring, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann, *Pollen grains induce a rapid and biphasic eczematous immune response in atopic eczema patients*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2007. in press.
55. Eyerich, K., J. Huss-Marp, U. Darsow, A. Wollenberg, S. Forster, J. Ring, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann, *Pollen Grains Induce a Rapid and Biphasic Eczematous Immune Response in Atopic Eczema Patients*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007. 145(3): p. 213-223.
56. Fan, L., B.W. Busser, T.Q. Lifsted, M. Oukka, D. Lo, and T.M. Laufer, *Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): p. 3386-91.

57. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. 4(4): p. 330-6.
58. Forrest, S., K. Dunn, K. Elliott, E. Fitzpatrick, J. Fullerton, M. McCarthy, J. Brown, D. Hill, and R. Williamson, *Identifying genes predisposing to atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol, 1999. 104(5): p. 1066-70.
59. Gamerdinger, K., C. Moulon, D.R. Karp, J. Van Bergen, F. Koning, D. Wild, U. Pflugfelder, and H.U. Weltzien, *A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel*. J Exp Med, 2003. 197(10): p. 1345-53.
60. Gaspari, A.A., M.K. Jenkins, and S.I. Katz, *Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones*. J Immunol, 1988. 141(7): p. 2216-20.
61. Gaspari, A.A. and S.I. Katz, *Induction and functional characterization of class II MHC (Ia) antigens on murine keratinocytes*. J Immunol, 1988. 140(9): p. 2956-63.
62. Gatti, E. and P. Pierre, *Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution*. Curr Opin Cell Biol, 2003. 15(4): p. 468-73.
63. Geginat, J., S. Campagnaro, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines*. Adv Exp Med Biol, 2002. 512: p. 107-12.
64. Gesundheit, D.B.f., *Bedarfsgegenständeverordnung vom 10. April 1992. Bundesgesetzblatt 1992, Teil 1:866 1992*.
65. Girolomoni, G., P. Gisondi, C. Ottaviani, and A. Cavani, *Immunoregulation of allergic contact dermatitis*. J Dermatol, 2004. 31(4): p. 264-70.
66. Giustizieri, M.L., F. Mascia, A. Frezzolini, O. De Pita, L.M. Chinni, A. Giannetti, G. Girolomoni, and S. Pastore, *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(5): p. 871-7.
67. Goebeler, M., A. Trautmann, A. Voss, E.V. Brocker, A. Toksoy, and R. Gillitzer, *Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity*. Am J Pathol, 2001. 158(2): p. 431-40.
68. Green, E.A., Y. Choi, and R.A. Flavell, *Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals*. Immunity, 2002. 16(2): p. 183-91.
69. Grewe, M., C.A. Bruijnzeel-Koomen, E. Schopf, T. Thepen, A.G. Langeveld-Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann, *A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Immunol Today, 1998. 19(8): p. 359-61.
70. Griem, P., C. von Vultee, K. Panthel, S.L. Best, P.J. Sadler, and C.F. Shaw, 3rd, *T cell cross-reactivity to heavy metals: identical cryptic peptides may be presented from protein exposed to different metals*. Eur J Immunol, 1998. 28(6): p. 1941-7.
71. Grindebacke, H., K. Wing, A.C. Andersson, E. Suri-Payer, S. Rak, and A. Rudin, *Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season*. Clin Exp Allergy, 2004. 34(9): p. 1364-72.
72. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo, *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. 389(6652): p. 737-42.

73. Gueniche, A., J. Viac, M. Charveron, and D. Schmitt, *Effect of gamma-interferon on IL-1 alpha, beta and receptor antagonist production by normal human keratinocytes*. *Exp Dermatol*, 1994. 3(3): p. 113-8.
74. Gueniche, A., J. Viac, G. Lizard, M. Charveron, and D. Schmitt, *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(2): p. 250-6.
75. Gueniche, A., J. Viac, G. Lizard, M. Charveron, and D. Schmitt, *Effect of various metals on intercellular adhesion molecule-1 expression and tumour necrosis factor alpha production by normal human keratinocytes*. *Arch Dermatol Res*, 1994. 286(8): p. 466-70.
76. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena, *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 621-67.
77. Gunther, C., C. Bello-Fernandez, T. Kopp, J. Kund, N. Carballido-Perrig, S. Hinteregger, S. Fassel, C. Schwarzler, G. Lametschwandtner, G. Stingl, T. Biedermann, and J.M. Carballido, *CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells*. *J Immunol*, 2005. 174(3): p. 1723-8.
78. Han, G.W., K. Iwatsuki, M. Inoue, T. Matsui, A. Nishibu, H. Akiba, and F. Kaneko, *Interleukin-15 is not a constitutive cytokine in the epidermis, but is inducible in culture or inflammatory conditions*. *Acta Derm Venereol*, 1999. 79(1): p. 37-40.
79. Hegewald, J., W. Uter, A. Pfahlberg, J. Geier, and A. Schnuch, *A multifactorial analysis of concurrent patch-test reactions to nickel, cobalt, and chromate*. *Allergy*, 2005. 60(3): p. 372-8.
80. Heratizadeh, A., P. Kienlin, I. Mittermann, R. Valenta, and T. Werfel, *Proliferation of skin-homing lymphocytes induced by the alpha-nascent polypeptide-associated complex (NAC, HOM S2) in adult patients with atopic dermatitis*. *Allergy, Abstract Book EAACI 2007, Göteborg, Schweden, 2007*.
81. Heufler, C., G. Topar, A. Grasseger, U. Stanzl, F. Koch, N. Romani, A.E. Namen, and G. Schuler, *Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes*. *J Exp Med*, 1993. 178(3): p. 1109-14.
82. Hijnen, D., M. De Bruin-Weller, B. Oosting, C. Lebre, E. De Jong, C. Bruijnzeel-Koomen, and E. Knol, *Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(2): p. 334-40.
83. Homey, B., H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E.P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A.I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann, and A. Zlotnik, *CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation*. *Nat Med*, 2002. 8(2): p. 157-65.
84. Homey, B., M.C. Dieu-Nosjean, A. Wiesenborn, C. Massacrier, J.J. Pin, E. Oldham, D. Catron, M.E. Buchanan, A. Muller, R. deWaal Malefyt, G. Deng, R. Orozco, T. Ruzicka, P. Lehmann, S. Lebecque, C. Caux, and A. Zlotnik, *Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis*. *J Immunol*, 2000. 164(12): p. 6621-32.

- 
85. Homey, B., W. Wang, H. Soto, M.E. Buchanan, A. Wiesenborn, D. Catron, A. Muller, T.K. McClanahan, M.C. Dieu-Nosjean, R. Orozco, T. Ruzicka, P. Lehmann, E. Oldham, and A. Zlotnik, *Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)*. J Immunol, 2000. 164(7): p. 3465-70.
86. Hon, K.L., T.F. Leung, K.C. Ma, A.M. Li, Y. Wong, and T.F. Fok, *Serum levels of cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK) as a laboratory marker of the severity of atopic dermatitis in children*. Clin Exp Dermatol, 2004. 29(3): p. 293-6.
87. Hudak, S., M. Hagen, Y. Liu, D. Catron, E. Oldham, L.M. McEvoy, and E.P. Bowman, *Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells*. J Immunol, 2002. 169(3): p. 1189-96.
88. Ikaheimo, I., A. Tiilikainen, J. Karvonen, and S. Silvennoinen-Kassinen, *HLA-DQA1 and DQB1 loci in nickel allergy patients*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. 100(3): p. 248-50.
89. Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman, *The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. 126(6): p. 1121-33.
90. Jaleco, S., L. Swainson, V. Dardalhon, M. Burjanadze, S. Kinet, and N. Taylor, *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(1): p. 61-8.
91. Janeway, C., P. Travers, M. Walport, and M. Slomchik, *Immunobiology; the immune system in health and disease*. 2005. 6th edition.
92. Johansson, S.G., T. Bieber, R. Dahl, P.S. Friedmann, B.Q. Lanier, R.F. Lockey, C. Motala, J.A. Ortega Martell, T.A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, and H.C. Williams, *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): p. 832-6.
93. Kaburagi, Y., Y. Shimada, T. Nagaoka, M. Hasegawa, K. Takehara, and S. Sato, *Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and eotaxin) in patients with atopic dermatitis*. Arch Dermatol Res, 2001. 293(7): p. 350-5.
94. Kakinuma, T., K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, and K. Tamaki, *Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis*. Clin Exp Immunol, 2002. 127(2): p. 270-3.
95. Kakinuma, T., H. Saeki, Y. Tsunemi, H. Fujita, N. Asano, H. Mitsui, Y. Tada, M. Wakugawa, T. Watanabe, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, K. Nakamura, and K. Tamaki, *Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(3): p. 592-7.
96. Kanda, N., S. Koike, and S. Watanabe, *IL-17 suppresses TNF-alpha-induced CCL27 production through induction of COX-2 in human keratinocytes*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 116(5): p. 1144-50.

97. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. 199(12): p. 1679-88.
98. Kawashima, T., E. Noguchi, T. Arinami, K. Yamakawa-Kobayashi, H. Nakagawa, F. Otsuka, and H. Hamaguchi, *Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families*. J Med Genet, 1998. 35(6): p. 502-4.
99. Kiistala, U., *Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis*. J Invest Dermatol, 1968. 50(2): p. 129-37.
100. Koizumi, H., K.C. Sato-Matsumura, H. Nakamura, K. Shida, S. Kikkawa, M. Matsumoto, K. Toyoshima, and T. Seya, *Distribution of IL-18 and IL-18 receptor in human skin: various forms of IL-18 are produced in keratinocytes*. Arch Dermatol Res, 2001. 293(7): p. 325-33.
101. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(7): p. 532-42.
102. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. 201(2): p. 233-40.
103. Laudanna, C., J.Y. Kim, G. Constantin, and E. Butcher, *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines*. Immunol Rev, 2002. 186: p. 37-46.
104. Lee, Y.A., U. Wahn, R. Kehrt, L. Tarani, L. Businco, D. Gustafsson, F. Andersson, A.P. Oranje, A. Wolkertstorfer, A. v Berg, U. Hoffmann, W. Kuster, T. Wienker, F. Ruschendorf, and A. Reis, *A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21*. Nat Genet, 2000. 26(4): p. 470-3.
105. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo, *T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(1 Pt 2): p. S109-12.
106. Lewis, J.B., J.C. Wataha, V. McCloud, P.E. Lockwood, R.L. Messer, and W.Y. Tseng, *Au(III), Pd(II), Ni(II), and Hg(II) alter NF kappa B signaling in THP1 monocytic cells*. J Biomed Mater Res A, 2005. 74(3): p. 474-81.
107. Li, W., S.I. Kashiwamura, H. Ueda, A. Sekiyama, and H. Okamura, *Protection of CD8+ T cells from activation-induced cell death by IL-18*. J Leukoc Biol, 2007.
108. Li, X.C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. Coyle, T.R. Malek, and T.B. Strom, *IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo*. Nat Med, 2001. 7(1): p. 114-8.
109. Ling, E.M., T. Smith, X.D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V.A. Carr, and D.S. Robinson, *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. 363(9409): p. 608-15.
110. Liu, Y.J., *Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation*. J Exp Med, 2006. 203(2): p. 269-73.
111. Menne, T. and N.V. Holm, *Hand eczema in nickel-sensitive female twins. Genetic predisposition and environmental factors*. Contact Dermatitis, 1983. 9(4): p. 289-96.
112. Mosialos, G., *Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. 12(2-3): p. 259-70.

113. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. 136(7): p. 2348-57.
114. Mossabeb, R., S. Seiberler, I. Mittermann, R. Reininger, S. Spitzauer, S. Natter, P. Verdino, W. Keller, D. Kraft, and R. Valenta, *Characterization of a novel isoform of alpha-nascent polypeptide-associated complex as IgE-defined autoantigen*. J Invest Dermatol, 2002. 119(4): p. 820-9.
115. Moulon, C., Y. Choleva, H.J. Thierse, D. Wild, and H.U. Weltzien, *T cell receptor transfection shows non-HLA-restricted recognition of nickel by CD8+ human T cells to be mediated by alphabeta T cell receptors*. J Invest Dermatol, 2003. 121(3): p. 496-501.
116. Moulon, C., J. Vollmer, and H.U. Weltzien, *Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel*. Eur J Immunol, 1995. 25(12): p. 3308-15.
117. Mozzanica, N., L. Rizzolo, G. Veneroni, R. Diotti, S. Hepeisen, and A.F. Finzi, *HLA-A, B, C and DR antigens in nickel contact sensitivity*. Br J Dermatol, 1990. 122(3): p. 309-13.
118. Muller, G., J. Saloga, T. Germann, I. Bellinghausen, M. Mohamadzadeh, J. Knop, and A.H. Enk, *Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12*. J Clin Invest, 1994. 94(5): p. 1799-805.
119. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, and H. Okamura, *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. 12(1): p. 53-72.
120. Nasorri, F., S. Sebastiani, V. Mariani, O. De Pita, P. Puddu, G. Girolomoni, and A. Cavani, *Activation of nickel-specific CD4+ T lymphocytes in the absence of professional antigen-presenting cells*. J Invest Dermatol, 2002. 118(1): p. 172-9.
121. Nestle, F.O., H. Speidel, and M.O. Speidel, *Metallurgy: high nickel release from 1- and 2-euro coins*. Nature, 2002. 419(6903): p. 132.
122. Neuber, K., K. Steinrucke, L. Kowalzik, I. Kohler, and J. Ring, *Cytokine-mediated effects of peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic eczema on keratinocytes (HaCaT) in a new coculture system*. Br J Dermatol, 1995. 133(5): p. 750-6.
123. Novak, N., J.P. Allam, T. Hagemann, C. Jenneck, S. Laffer, R. Valenta, J. Kochan, and T. Bieber, *Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(2): p. 364-70.
124. Novak, N. and T. Bieber, *[Pathogenesis of atopic eczema]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2005. 3(12): p. 994-1004; quiz 1005-6.
125. Novak, N., S. Kraft, J. Haberstock, E. Geiger, P. Allam, and T. Bieber, *A reducing microenvironment leads to the generation of FcepsilonRIhigh inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC)*. J Invest Dermatol, 2002. 119(4): p. 842-9.
126. Novak, N., R. Valenta, B. Bohle, S. Laffer, J. Haberstock, S. Kraft, and T. Bieber, *FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): p. 949-57.



127. Ohnishi, Y., N. Okino, M. Ito, and S. Imayama, *Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. 6(1): p. 101-4.
128. Ong, P.Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R.L. Gallo, and D.Y. Leung, *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med, 2002. 347(15): p. 1151-60.
129. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein, *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. 13(5): p. 715-25.
130. Ou, L.S., E. Goleva, C. Hall, and D.Y. Leung, *T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(4): p. 756-63.
131. Owaki, T., M. Asakawa, F. Fukai, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto, *IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways*. J Immunol, 2006. 177(11): p. 7579-87.
132. Palacio, S., D. Schmitt, and J. Viac, *Contact allergens and sodium lauryl sulphate upregulate vascular endothelial growth factor in normal keratinocytes*. Br J Dermatol, 1997. 137(4): p. 540-4.
133. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1133-41.
134. Pastore, S., S. Corinti, M. La Placa, B. Didona, and G. Girolomoni, *Interferon-gamma promotes exaggerated cytokine production in keratinocytes cultured from patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1998. 101(4 Pt 1): p. 538-44.
135. Pastore, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, L.M. Chinni, A. Giannetti, and G. Girolomoni, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin*. J Clin Invest, 1997. 99(12): p. 3009-17.
136. Pastore, S., M.L. Giustizieri, F. Mascia, A. Giannetti, K. Kaushansky, and G. Girolomoni, *Dysregulated activation of activator protein 1 in keratinocytes of atopic dermatitis patients with enhanced expression of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*. J Invest Dermatol, 2000. 115(6): p. 1134-43.
137. Picker, L.J., R.J. Martin, A. Trumble, L.S. Newman, P.A. Collins, P.R. Bergstresser, and D.Y. Leung, *Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites*. Eur J Immunol, 1994. 24(6): p. 1269-77.
138. Piskin, G., R.M. Sylva-Steenland, J.D. Bos, and M.B. Teunissen, *In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin*. J Immunol, 2006. 176(3): p. 1908-15.
139. Pivarcsi, A., M. Gombert, M.C. Dieu-Nosjean, A. Lauerma, R. Kubitzka, S. Meller, J. Rieker, A. Muller, L. Da Cunha, A. Haahtela, E. Sonkoly, W.H. Fridman, H. Alenius, L. Kemeny, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey, *CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure*. J Immunol, 2004. 173(9): p. 5810-7.

140. Plitz, T., P. Saint-Mezard, M. Satho, S. Herren, C. Waltzinger, M. de Carvalho Bittencourt, M.H. Kosco-Vilbois, and Y. Chvatchko, *IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity*. J Immunol, 2003. 171(3): p. 1164-71.
141. Purwar, R., T. Werfel, and M. Wittmann, *IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2006. 126(5): p. 1043-51.
142. Qin, J.Z., P. Bacon, V. Chaturvedi, and B.J. Nickoloff, *Role of NF-kappaB activity in apoptotic response of keratinocytes mediated by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand*. J Invest Dermatol, 2001. 117(4): p. 898-907.
143. Raskovalova, T., A. Lokshin, X. Huang, Y. Su, M. Mandic, H.M. Zarour, E.K. Jackson, and E. Gorelik, *Inhibition of Cytokine Production and Cytotoxic Activity of Human Antimelanoma Specific CD8+ and CD4+ T Lymphocytes by Adenosine-Protein Kinase A Type I Signaling*. Cancer Res, 2007. 67(12): p. 5949-56.
144. Reich, K., G. Westphal, I.R. Konig, R. Mossner, U. Kruger, A. Ziegler, C. Neumann, and A. Schnuch, *Association of allergic contact dermatitis with a promoter polymorphism in the IL16 gene*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(6): p. 1191-4.
145. Ring, J. and A. Zumbusch, *Neurodermitis - Ursachen und Therapien*. C.H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung, 2000.
146. Robert, C. and T.S. Kupper, *Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance*. N Engl J Med, 1999. 341(24): p. 1817-28.
147. Robinson, D.S., M. Larche, and S.R. Durham, *Tregs and allergic disease*. J Clin Invest, 2004. 114(10): p. 1389-97.
148. Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M.K. Levings, *Type 1 T regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. 182: p. 68-79.
149. Rottman, J.B., T.L. Smith, K.G. Ganley, T. Kikuchi, and J.G. Krueger, *Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris*. Lab Invest, 2001. 81(3): p. 335-47.
150. Ruckert, R., K. Asadullah, M. Seifert, V.M. Budagian, R. Arnold, C. Trombotto, R. Paus, and S. Bulfone-Paus, *Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?* J Immunol, 2000. 165(4): p. 2240-50.
151. Sager, N., A. Feldmann, G. Schilling, P. Kreitsch, and C. Neumann, *House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test*. J Allergy Clin Immunol, 1992. 89(4): p. 801-10.
152. Sainio, E.L., R. Jolanki, E. Hakala, and L. Kanerva, *Metals and arsenic in eye shadows*. Contact Dermatitis, 2000. 42(1): p. 5-10.
153. Santamaria Babi, L.F., B. Moser, M.T. Perez Soler, R. Moser, P. Loetscher, B. Villiger, K. Blaser, and C. Hauser, *The interleukin-8 receptor B and CXC chemokines can mediate transendothelial migration of human skin homing T cells*. Eur J Immunol, 1996. 26(9): p. 2056-61.
154. Santamaria Babi, L.F., R. Moser, M.T. Perez Soler, L.J. Picker, K. Blaser, and C. Hauser, *Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)*. J Immunol, 1995. 154(4): p. 1543-50.

155. Santamaria Babi, L.F., M.T. Perez Soler, C. Hauser, and K. Blaser, *Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation*. Immunol Res, 1995. 14(4): p. 317-24.
156. Schaerli, P., L. Ebert, K. Willimann, A. Blaser, R.S. Roos, P. Loetscher, and B. Moser, *A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells*. J Exp Med, 2004. 199(9): p. 1265-75.
157. Schaerli, P., K. Willimann, L.M. Ebert, A. Walz, and B. Moser, *Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation*. Immunity, 2005. 23(3): p. 331-42.
158. Schafer, T., E. Bohler, S. Ruhdorfer, L. Weigl, D. Wessner, B. Filipiak, H.E. Wichmann, and J. Ring, *Epidemiology of contact allergy in adults*. Allergy, 2001. 56(12): p. 1192-6.
159. Scheyenius, A., *Malassezia hypersensitivity*. EAACI 2007, Göteborg, Schweden, 9.-13.06.2007, 2007.
160. Schmuth, M., S. Neyer, C. Rainer, A. Grassegger, P. Fritsch, N. Romani, and C. Heufler, *Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function*. Exp Dermatol, 2002. 11(2): p. 135-42.
161. Schnuch, A., J. Geier, H. Lessmann, and W. Uter, *[Decrease in nickel sensitization in young patients--successful intervention through nickel exposure regulation? Results of IVDK, 1992-2001]*. Hautarzt, 2003. 54(7): p. 626-32.
162. Schnuch, A., W. Uter, J. Geier, and O. Gefeller, *Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach*. Contact Dermatitis, 2002. 47(1): p. 32-9.
163. Schroder, J.M. and J. Harder, *Antimicrobial skin peptides and proteins*. Cell Mol Life Sci, 2006. 63(4): p. 469-86.
164. Schwarz, T., *No eczema without keratinocyte death*. J Clin Invest, 2000. 106(1): p. 9-10.
165. Sebastiani, S., P. Allavena, C. Albanesi, F. Nasorri, G. Bianchi, C. Traidl, S. Sozzani, G. Girolomoni, and A. Cavani, *Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity*. J Immunol, 2001. 166(2): p. 996-1002.
166. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003. 4(9): p. 835-42.
167. Silvennoinen-Kassinen, S., I. Ikaheimo, and A. Tiilikainen, *TAP1 and TAP2 genes in nickel allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. 114(1): p. 94-6.
168. Simon, J.C., A. Dietrich, V. Mielke, C. Wuttig, W. Vanscheidt, P.S. Linsley, E. Schopf, and W. Sterry, *Expression of the B7/BB1 activation antigen and its ligand CD28 in T-cell-mediated skin diseases*. J Invest Dermatol, 1994. 103(4): p. 539-43.
169. Sitkovsky, M.V., D. Lukashev, S. Apasov, H. Kojima, M. Koshiba, C. Caldwell, A. Ohta, and M. Thiel, *Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 657-82.
170. Smith, F.J., A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, A. Sandilands, L.E. Campbell, Y. Zhao, H. Liao, A.T. Evans, D.R. Goudie, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, C.S. Munro, A. Sergeant, G. O'Regan, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, R.B. Presland, P. Fleckman, and W.H. McLean, *Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris*. Nat Genet, 2006. 38(3): p. 337-42.

171. Smithson, G., C.E. Rogers, P.L. Smith, E.P. Scheidegger, B. Petryniak, J.T. Myers, D.S. Kim, J.W. Homeister, and J.B. Lowe, *Fuc-TVII is required for T helper 1 and T cytotoxic 1 lymphocyte selectin ligand expression and recruitment in inflammation, and together with Fuc-TIV regulates naive T cell trafficking to lymph nodes*. J Exp Med, 2001. 194(5): p. 601-14.
172. Soumelis, V., P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R.A. Kastelein, and Y.J. Liu, *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat Immunol, 2002. 3(7): p. 673-80.
173. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. 76(2): p. 301-14.
174. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. 13(2): p. 139-45.
175. Strid, J., J. Hourihane, I. Kimber, R. Callard, and S. Strobel, *Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response*. Eur J Immunol, 2004. 34(8): p. 2100-9.
176. Taams, L.S., M. Vukmanovic-Stejic, J. Smith, P.J. Dunne, J.M. Fletcher, F.J. Plunkett, S.B. Ebeling, G. Lombardi, M.H. Rustin, J.W. Bijlsma, F.P. Lafeber, M. Salmon, and A.N. Akbar, *Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2002. 32(6): p. 1621-30.
177. Taieb, A., *Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders*. Contact Dermatitis, 1999. 41(4): p. 177-80.
178. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi, *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. 192(2): p. 303-10.
179. Thepen, T., E.G. Langeveld-Wildschut, I.C. Bihari, D.F. van Wichen, F.C. van Reijssen, G.C. Mudde, and C.A. Bruijnzeel-Koomen, *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(3): p. 828-37.
180. Thorner, M., *Pathological conditions following piercing of the lobules of the ear*. J Am Med Assoc 22:110-112, 1894. 22: p. 110-112.
181. Traidl-Hoffmann, C., V. Mariani, H. Hochrein, K. Karg, H. Wagner, J. Ring, M.J. Mueller, T. Jakob, and H. Behrendt, *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization*. J Exp Med, 2005. 201(4): p. 627-36.
182. Traidl, C., F. Jugert, T. Krieg, H. Merk, and N. Hunzelmann, *Inhibition of allergic contact dermatitis to DNCB but not to oxazolone in interleukin-4-deficient mice*. J Invest Dermatol, 1999. 112(4): p. 476-82.
183. Traidl, C., S. Sebastiani, C. Albanesi, H.F. Merk, P. Puddu, G. Girolomoni, and A. Cavani, *Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes*. J Immunol, 2000. 165(6): p. 3058-64.
184. Trautmann, A., M. Akdis, K. Blaser, and C.A. Akdis, *Role of dysregulated apoptosis in atopic dermatitis*. Apoptosis, 2000. 5(5): p. 425-9.

185. Trautmann, A., M. Akdis, D. Kleemann, F. Altnauer, H.U. Simon, T. Graeve, M. Noll, E.B. Brocker, K. Blaser, and C.A. Akdis, *T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis*. J Clin Invest, 2000. 106(1): p. 25-35.
186. Trautmann, A., F. Altnauer, M. Akdis, H.U. Simon, R. Disch, E.B. Brocker, K. Blaser, and C.A. Akdis, *The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis*. J Invest Dermatol, 2001. 117(4): p. 927-34.
187. Uter, W., A. Pfahlberg, O. Gefeller, J. Geier, and A. Schnuch, *Risk factors for contact allergy to nickel - results of a multifactorial analysis*. Contact Dermatitis, 2003. 48(1): p. 33-8.
188. van Reijssen, F.C., C.A. Bruijnzeel-Koomen, F.S. Kalthoff, E. Maggi, S. Romagnani, J.K. Westland, and G.C. Mudde, *Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1992. 90(2): p. 184-93.
189. Vassina, E., M. Leverkus, S. Yousefi, L.R. Braathen, H.U. Simon, and D. Simon, *Increased expression and a potential anti-inflammatory role of TRAIL in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2005. 125(4): p. 746-52.
190. Verhagen, J., M. Akdis, C. Traidl-Hoffmann, P. Schmid-Grendelmeier, D. Hijnen, E.F. Knol, H. Behrendt, K. Blaser, and C.A. Akdis, *Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(1): p. 176-83.
191. Viac, J., A. Gueniche, H. Gatto, G. Lizard, and D. Schmitt, *Interleukin-4 and interferon-gamma interactions in the induction of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class II antigen expression of normal human keratinocytes*. Exp Dermatol, 1994. 3(2): p. 72-7.
192. Vicanova, J., E. Boelsma, A.M. Mommaas, J.A. Kempenaar, B. Forslind, J. Pallon, T. Egelrud, H.K. Koerten, and M. Ponc, *Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation*. J Invest Dermatol, 1998. 111(1): p. 97-106.
193. Viemann, D., M. Schmidt, K. Tenbrock, S. Schmid, V. Muller, K. Klimmek, S. Ludwig, J. Roth, and M. Goebeler, *The contact allergen nickel triggers a unique inflammatory and proangiogenic gene expression pattern via activation of NF-kappaB and hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Immunol, 2007. 178(5): p. 3198-207.
194. Vollmer, J., M. Fritz, A. Dormoy, H.U. Weltzien, and C. Moulon, *Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity*. Eur J Immunol, 1997. 27(8): p. 1865-74.
195. Wagers, A.J., C.M. Waters, L.M. Stoolman, and G.S. Kansas, *Interleukin 12 and interleukin 4 control T cell adhesion to endothelial selectins through opposite effects on alpha1, 3-fucosyltransferase VII gene expression*. J Exp Med, 1998. 188(12): p. 2225-31.
196. Wang, B., H. Fujisawa, L. Zhuang, I. Freed, B.G. Howell, S. Shahid, G.M. Shivji, T.W. Mak, and D.N. Sauder, *CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity*. J Immunol, 2000. 165(12): p. 6783-90.

197. Weidinger, S., T. Illig, H. Baurecht, A.D. Irvine, E. Rodriguez, A. Diaz-Lacava, N. Klopp, S. Wagenpfeil, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, C.N. Palmer, C. Jenneck, L. Maintz, T. Hagemann, H. Behrendt, J. Ring, M.M. Nothen, W.H. McLean, and N. Novak, *Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(1): p. 214-9.
198. Werfel, T., M. Hentschel, A. Kapp, and H. Renz, *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(5): p. 2500-5.
199. Westphal, G.A., K. Reich, T.G. Schulz, C. Neumann, E. Hallier, and A. Schnuch, *N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms in para-substituted arylamine-induced contact allergy*. Br J Dermatol, 2000. 142(6): p. 1121-7.
200. Westphal, G.A., A. Schnuch, R. Moessner, I.R. Konig, B. Kranke, E. Hallier, A. Ziegler, and K. Reich, *Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis*. Contact Dermatitis, 2003. 48(2): p. 93-8.
201. Wittmann, M., R. Purwar, C. Hartmann, R. Gutzmer, and T. Werfel, *Human keratinocytes respond to interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2005. 124(6): p. 1225-33.
202. Wollenberg, A., S. Kraft, D. Hanau, and T. Bieber, *Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema*. J Invest Dermatol, 1996. 106(3): p. 446-53.
203. Wollenberg, A., M. Wagner, S. Gunther, A. Towarowski, E. Tuma, M. Moderer, S. Rothenfusser, S. Wetzel, S. Endres, and G. Hartmann, *Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2002. 119(5): p. 1096-102.
204. Yamanaka, K., R. Clark, R. Dowgiert, D. Hurwitz, M. Shibata, B.E. Rich, K. Hirahara, D.A. Jones, S. Eapen, H. Mizutani, and T.S. Kupper, *Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2006. 12(2): p. 376-82.

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidrun Behrendt, der Leiterin des ZAUM - Zentrum Allergie und Umwelt, die es mir ermöglicht hat an ihrem Institut zu promovieren.

Bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Harun Parlar, möchte ich mich für die Betreuung meiner Promotion bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich auch an PD Dr. Claudia Traidl-Hoffmann richten für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und die immer wieder aufmunternden Worte bei kleinen Misserfolgen.

Kilian Eyerich, danke für deine Geduld, die kritische Begutachtung dieses Manuskriptes, die vielen fruchtbaren Diskussionen und dafür, dass du immer wieder versuchst einen grenzenlosen Optimisten aus mir zu machen.

Danke an alle ZAUMler für die gute Stimmung und die motivierte Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen gilt dieser Dank Frau Gaby Pleyl-Wisgickl für die ausgezeichnete technische Unterstützung und meinen wissenschaftlichen Mitstreitern, Cornelia Blume und Stefanie Gilles, für die unterhaltsamen und inspirierenden Diskussionen zur Kaffeezeit.

Mein allergrößter Dank gebührt meinen Eltern für jede erdenkliche Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

# LEBENS LAUF

---

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Stefanie Förster  
Adresse: Erzgiessereistr. 18c, 80335 München  
Telephon: +4989-54320720 / +49163-4412375  
Email: stefanie.foerster@lrz.tum.de  
Geburtsdatum: 13. July 1978  
Geburtsort: Regensburg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## AUSBILDUNG

---

Seit Okt. 2007 Studium der Wirtschaftswissenschaften; Fernuniversität Hagen  
März 2004 Diplomprüfung [**Gesamtnote: 1.2**]  
Okt. 2000-Mai 2003 Studium der Biologie; Ludwig Maximilian Universität, München  
Hauptfach: Humangenetik und Humanbiologie  
Nebenfächer: Immunologie, Infektionsbiologie, Mikrobiologie  
Okt. 1998-Sep. 1999 Studium der Biologie; Universität Regensburg  
Mai 1998 Abitur [**Note : 2.2**]  
1988-1998 Gymnasium Neutraubling  
1984-1988 Grundschule Neutraubling

## WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

---

Seit Mai 2004 DISSERTATION  
Titel: Untersuchungen zum interzellulären Diskurs von Keratinozyten und T-Zellen in einem Allergenspezifischen *in vitro* Modell der Effektorphase der allergischen Kontaktdermatitis und des akuten atopischen Ekzems  
Institut: ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt  
Technische Universität München  
Leiterin: Prof. Dr. Heidrun Behrendt  
Gruppe Zelluläre Immunologie, PD Dr. Claudia Traidl-Hoffmann

Juni 2003-März 2004 DIPLOMARBEIT  
Titel: Insertion eines Zell-Suizid Genes in den CCL17 Locus embryonaler Stammzellen der Maus  
Institut: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
Technische Universität München  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Phd  
Gruppe von Prof. Dr. Irmgard

Sep. 2001-Mai 2004 WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITERIN  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
Technische Universität München  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Phd  
Gruppe von Prof. Dr. Klaus Pfeffer und Prof. Dr. Irmgard Förster



ANHANG

Systematischer Name	Historischer Name	Rezeptoren	Zielzelle
CCL1	I-309	CCR8	T, N
CCL2	MCP-1	CCR2	T, M, Ba
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub> , M/M $\Phi$ , NK,
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub> , M/M $\Phi$ , NK,
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub> , M/M $\Phi$ , NK,
CCL7	MCP3	CCR1, CCR2, CCR3	T, M, E, Ba, DZ
CCL11	Eotaxin	CCR3	E
CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3	T, M, E, Ba, DZ
CCL17	TARC	CCR4	T <sub>H2</sub> >T <sub>H1</sub> , iDZ, NK
CCL18	PARC	unbekannt	nT>T
CCL20	MIP-3 $\alpha$	CCR6	T, DZ, B
CCL21	SLC	CCR7	nT, B
CCL22	MDZ	CCR4	T <sub>H2</sub> >T <sub>H1</sub> , iDZ, NK
CCL27	CTACK	CCR10	T
CCL28	MEC	CCR3, CCR10	T, E
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	T, N, B
CXCL9	MIG	CXCR3	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub>
CXCL10	IP-10	CXCR3	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub>
CXCL11	I-TAC	CXCR3	T <sub>H1</sub> >T <sub>H2</sub>
CXCL12	SDF-1 $\alpha$	CXCR4	CD4 <sup>+</sup> T, DZ, B
CXCL14	BRAK	unbekannt	T, M
CX3CL1	Fraktalkin	CX3CR1	T, M, N

**Tabelle 1, Anhang: Chemokine und ihre Rezeptoren**

T: T-Zelle, T<sub>H1</sub> bzw. T<sub>H2</sub>; iDZ bzw. DZ: immature bzw. reife dendritische Zelle; B: B-Zelle; M: Monozyt; M $\Phi$ : Makrophage; N: Neutrophile; Ba: Basophile; E: Eosinophile

ANHANG

Konstitutiv	Induziert	Stimuli
<b>ZYTOKINE</b>		
-	TNF- $\alpha$	IL-1 $\alpha$ , LPS, UVB, Haptene
-	GM-CSF	IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, UVB,
IL-1 $\alpha$	+	IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, UVB,
IL-1 $\beta$	+	IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , LPS, UVB, Haptene
IL-1RA	+	IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, UVB
IL-6	+	IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, LPS, Haptene
-	IL-7	IL-1 $\alpha$
-	IL-10	UVB
-	IL-15	IFN- $\gamma$
IL-18	+	TNF- $\alpha$ , LPS, UVB, Haptene
-	IL-19	unbekannt
-	IL-20	unbekannt
-	$\alpha$ -MSH	IL-1 $\alpha$ , UVB
VEGF	+	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , UVB
TGF- $\beta$	+	UVB, RA
<b>CHEMOKINE</b>		
-	CXCL1	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
CXCL8	+	IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, UVB,
-	CXCL9	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4
-	CXCL10	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4
-	CXCL11	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4
-	CCL1	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
-	CCL2	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Haptene
-	CCL5	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
-	CCL13	unbekannt
CCL17	+	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
CCL20	+	IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, CD40L
-	CCL22	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
CCL27	+	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Haptene
<b>MEMBRAN MOLEKÜLE</b>		
-	ICAM-1 (sICAM-1)	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, Haptene
MHC-Klasse I	+	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
-	MHC-Klasse II	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
CD40	+	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
-	PD-1	IFN- $\gamma$

Tabelle 2, Anhang: Von Keratinozyten produzierte Zytokine, Chemokine und Oberflächenmoleküle

DATEN-ANHANG

Abb. 11	A	cpm	B	Klon	nPhl p 1	APE
		CD4		50,47		1p1-4.1
	CD8	16,12		1p1-4.2	30,98	1,05
				1p1-4.6	26,90	0,99
				1p1-4.12	102,47	1,70
				1p1-4.16	64,41	1,83
				1p1-4.20	38,56	1,48
				1p1-4.23	0,96	32,12
				1p1-4.25	2,33	1,15
				1p1-4.30	71,39	183,85
				1p1-4.36	21,83	136,08
				1p1-4.37	1,47	54,56
				1p1-4.42	0,78	2,57
				1p1-4.44	12,55	10,55
				1p1-4.49	1,99	11,53
				1p1-8.2	2,37	0,57

Abb. 13	T alone		T+APZ	
	MW	SEM	MW	SEM
1Ni-4.17	17,697	11,443	43,633	20,040
1Ni-4.20	6,630	1,840	15,870	0,010
1Ni-4.27	13,159	4,109	24,749	7,059
1Ni-4.8	26,985	9,430	36,605	6,823
2Ni-8.2	4,328	0,378	5,734	1,002
4Ni-4.2	6,627	1,742	36,828	12,626
3Ni-4.13	94,402	36,612	66,072	32,322
3Ni-4.18	16,820	2,013	26,978	8,514

Abb. 17	Klon	Proliferation			n	K IFN	SEM
		n	K	SEM			
	1Ni-4.16	6	60,37	6,93	11	81,49	13,19
	1Ni-4.17				3	75,08	29,20
	1Ni-4.20	1	11,80		3	31,35	17,31
	1Ni-4.27	2	97,28	2,71	4	76,12	10,20
	4Ni-4.10	3	61,61	7,43	3	56,64	11,47
	4Ni-4.2	3	55,33	4,10	3	52,00	1,31
	4Ni-4.106	3	28,54	5,94	3	26,50	7,49
	4Ni-4.38	2	66,12	1,99	2	52,91	12,80
	4Ni-4.21	1	48,38		1	52,92	
	3Ni-4.13	9	83,96	6,78	9	92,19	6,10
	3Ni-4.18	1	102,94		2	79,22	21,72
	3Ni-4.1	3	59,57	6,91	3	45,24	7,95
	5Ni-4.10	4	76,21	5,55	4	58,97	8,27
	5Ni-4.3	3	58,13	14,04	3	66,75	9,36
	5Ni-4.20	3	50,83	10,99	3	61,66	0,01
	5Ni-4.63	4	57,04	11,62	4	50,11	6,33
	5Ni-4.65	1	30,25		1	34,26	
	5Ni-48.1	3	46,30	4,73	3	67,36	9,41
	5Ni-8.7	2	71,06	14,34	2		
	5Ni-8.8	3	55,27	10,80	3	73,44	12,70
	5Ni-8.9	4	77,82	5,37	4	84,35	4,67
	5Ni-8.10	2	38,43	13,27	2	42,04	0,27
	5Ni-8.11	2	39,01	5,55	2	48,30	3,29
	5Ni-4.22	1	44,19		1	52,14	
	5Ni-8.50	1	53,75		1	66,50	
	5Ni-4.17	1	34,69		1	51,24	
	5Ni-4.16	4	48,92	10,01	4	48,53	5,52
	<i>Mittelwert</i>		64,39	5,07		70,26	5,44

Abb. 18

Klon	Proliferation					
	n	K	SEM	n	K IFN	SEM
1Ni-4.1	1	80,86		5	124,77	8,10
1Ni-4.2	1	128,96		3	148,32	17,76
1Ni-4.8	2	93,98	7,02	4	154,40	30,96
2Ni-8.2	2	142,43	2,71	5	121,90	8,59
5Ni-4.52	1	92,06		1	101,49	
<i>Mittelwert</i>		<i>107,66</i>	<i>10,60</i>		<i>130,18</i>	<i>8,57</i>

Abb. 19

	Kontrolle		K		K IFN	
	R2	R3	R2	R3	R2	R3
d 0	96,95	2,12	96,28	2,63	96,69	2,48
d 4	86,26	13,55	77,55	22,41	88,86	10,40
d 6	68,57	31,20	58,24	41,63	76,71	23,09
d 8	52,93	7,30	40,78	59,52	65,92	35,00
d 10	57,64	41,78	45,43	54,32	66,14	34,27

Abb. 20

	Klon	Proliferation					
		n	K	SEM	n	K IFN	SEM
mit APZ	1Ni-4.17				3	75,08	29,20
	1Ni-4.20	1	11,80		3	31,35	17,31
	1Ni-4.27	2	97,28	2,71	4	76,12	10,20
	1Ni-4.8	2	93,98	7,02	4	154,40	30,96
	2Ni-8.2	2	142,43	2,71	5	121,90	8,59
	4Ni-4.2	3	55,33	4,10	3	52,00	1,31
	3Ni-4.13	9	83,96	6,78	9	92,19	6,10
	3Ni-4.18	1	102,94		2	79,22	21,72
	<i>Mittelwert</i>		<i>83,96</i>	<i>14,34</i>		<i>85,28</i>	<i>12,75</i>
ohne APZ	1Ni-4.17				3	21,48	9,20
	1Ni-4.20				2	22,76	21,19
	1Ni-4.27	2	57,46		4	25,75	7,61
	1Ni-4.8	2			6	200,55	54,74
	2Ni-8.2	2	28,94	1,19	4	39,48	20,08
	4Ni-4.2	5	12,40	1,79	5	11,62	1,63
	3Ni-4.13	6	66,32	19,52	6	37,18	12,25
	3Ni-4.18	5	75,59	9,36	5	59,21	11,72
	<i>Mittelwert</i>		<i>48,14</i>	<i>10,61</i>		<i>52,25</i>	<i>20,39</i>

Abb. 21

Klon	Proliferation					
	n	K	SEM	n	K IFN	SEM
1p1-4.2	1	23,97		1	25,70	
1p1-4.16	2	43,07	11,67	2	63,60	29,90
1p1-4.30	3	8,45	0,51	3	20,04	2,72
1p1-4.36	3	9,94	0,96	3	13,24	1,92
1p1-4.1	4	101,87	2,68	4	113,45	4,27
1p1-4.12	4	109,99	3,96	4	120,15	5,90
1p1-4.44	4	90,42	1,81	4	94,27	2,53
2p1-4.5	2			2	37,51	18,43
<i>Mittelwert</i>		<i>55,39</i>	<i>15,50</i>		<i>60,99</i>	<i>14,32</i>

Abb. 22

Zytokine, K

DATEN-ANHANG

Klon	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
1Ni-4.16	6	18,13		80,56	6,67		
1Ni-4.17							
1Ni-4.20	1	65,63				38,82	
1Ni-4.27	2	72,05	1,02	89,63		79,25	
4Ni-4.10	3	72,59	5,04	61,42	10,71	37,73	5,87
4Ni-4.2	3	65,52	2,72	46,67	7,03	46,88	19,39
4Ni-4.106	3	32,53	5,46	37,73	2,39	51,84	6,71
4Ni-4.38	2	107,87	50,90	21,55	12,87	61,43	49,59
4Ni-4.21	1			62,80		56,16	
3Ni-4.13	9	63,20	5,95	77,73	7,35	49,86	8,32
3Ni-4.18	1	93,48		99,10		89,07	
3Ni-4.1	3	66,74	13,62			25,84	10,29
5Ni-4.10	4			49,29	12,08	39,86	8,09
5Ni-4.3	3	78,23	25,17	20,32	7,00	20,99	6,00
5Ni-4.20	3			66,00	18,90	22,08	5,14
5Ni-4.63	4			65,52		29,56	8,65
5Ni-4.65	1	39,48		3,69		2,62	
5Ni-48.1	3	37,27	9,06	36,18	17,41	13,75	7,25
5Ni-8.7	2	58,33	18,53	53,22	19,35	41,01	29,95
5Ni-8.8	3	27,01		56,73	19,66	11,55	4,68
5Ni-8.9	4	58,86	4,56	83,80	5,04	31,66	7,48
5Ni-8.10	2	12,96		7,40	2,99	4,13	1,69
5Ni-8.11	2	35,42		15,84	4,82	10,57	8,81
5Ni-4.22	1	60,94		42,20		36,76	
5Ni-8.50	1	55,95		57,05		5,62	
5Ni-4.17	1			16,11		2,40	
5Ni-4.16	4	29,21	7,40	34,90	7,89	32,99	1,25
<i>Mittelwert</i>		<i>56,87</i>	<i>5,14</i>	<i>54,31</i>	<i>5,28</i>	<i>34,30</i>	<i>4,36</i>

<i>Zytokine, K IFN</i>							
Klon	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
1Ni-4.16	11	162,34	62,82	105,84	8,64	14,96	12,13
1Ni-4.17	3	87,81	18,49	69,20	18,66	34,30	
1Ni-4.20	3	65,98		77,23		35,40	5,72
1Ni-4.27	4	76,36	6,85	32,58		34,13	20,61
4Ni-4.10	3	73,06	3,25	56,66	9,02	31,81	3,27
4Ni-4.2	3	51,55	4,51	47,04	8,77	10,42	
4Ni-4.106	3	20,66	6,99	18,69	7,26	49,59	9,66
4Ni-4.38	2	20,93	6,40	3,27		51,45	
4Ni-4.21	1	45,42		24,40		29,28	
3Ni-4.13	9	47,68	6,99	66,72	8,36	48,03	9,40
3Ni-4.18	2	85,80	65,44	63,94	26,61	42,07	15,32
3Ni-4.1	3	41,47	13,07			15,01	4,76
5Ni-4.10	4			22,93	7,27	16,07	4,90
5Ni-4.3	3	109,33	12,27	17,48	4,67	23,51	6,22
5Ni-4.20	3			37,31		18,23	0,00
5Ni-4.63	4			46,26		19,53	4,76
5Ni-4.65	1	79,71		6,37		3,82	
5Ni-48.1	3	39,52	7,83	37,08	10,90	14,05	5,37
5Ni-8.7	2						
5Ni-8.8	3	44,79	0,00	51,62	17,26	14,57	3,66
5Ni-8.9	4	49,78	6,51	68,83	7,99	34,89	7,11
5Ni-8.10	2	24,61	8,95	7,40	2,15	6,30	0,93
5Ni-8.11	2	69,11	14,73	18,69	6,01	21,80	19,14
5Ni-4.22	1	71,84		50,34		36,71	
5Ni-8.50	1	89,84		59,63		8,70	
5Ni-4.17	1			1,86		4,95	
5Ni-4.16	4	44,35	8,41	33,05	5,64	43,18	8,78
<i>Mittelwert</i>		<i>74,66</i>	<i>6,85</i>	<i>45,19</i>	<i>4,52</i>	<i>25,78</i>	<i>2,51</i>

DATEN-ANHANG

Abb. 23

Klon	Zytokine, K						
	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
1Ni-4.1	1	66,01				71,39	
1Ni-4.2	1	51,43		93,79			
1Ni-4.8	2	89,60		66,68		52,79	37,48
2Ni-8.2	2	108,16	3,79	117,73	8,08	22,80	3,71
5Ni-4.52	1	11,94		56,99		5,30	
<b>Mittelwert</b>		<b>65,43</b>	<b>14,79</b>	<b>83,80</b>	<b>10,64</b>	<b>38,07</b>	<b>11,48</b>

Klon	Zytokine, K IFN						
	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
1Ni-4.1	5	120,47	38,86	66,31	6,20	53,36	37,91
1Ni-4.2	3	177,24	16,90	72,36	17,94	16,80	9,65
1Ni-4.8	4	104,70		63,64	4,25	32,14	7,04
2Ni-8.2	5	101,20	3,53	78,76	16,39	25,01	3,17
5Ni-4.52	1	81,72		47,15		9,18	
<b>Mittelwert</b>		<b>117,06</b>	<b>14,54</b>	<b>65,64</b>	<b>4,75</b>	<b>27,30</b>	<b>6,77</b>

Abb. 24

	Klon	Zytokine, K						
		n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
mit APZ	1Ni-4.17							
	1Ni-4.20	1	65,63				38,82	
	1Ni-4.27	2	72,05	1,02	89,63		79,25	
	1Ni-4.8	2	89,60		66,68		52,79	37,48
	2Ni-8.2	2	108,16	3,79	117,73	8,08	22,80	3,71
	4Ni-4.2	3	65,52	2,72	46,67	7,03	46,88	19,39
	3Ni-4.13	9	63,20	5,95	77,73	7,35	49,86	8,32
	3Ni-4.18	1	93,48		99,10		89,07	
<b>Mittelwert</b>		<b>79,66</b>	<b>6,11</b>	<b>82,92</b>	<b>9,31</b>	<b>54,21</b>	<b>8,01</b>	
ohne APZ	1Ni-4.17							
	1Ni-4.20							
	1Ni-4.27	2	59,55		53,43			
	1Ni-4.8	2						
	2Ni-8.2	2	66,87	5,24	47,91	6,76		
	4Ni-4.2	5	28,03	18,77	51,53	21,37	13,98	0,00
	3Ni-4.13	6	91,40	14,97	71,24	5,42	31,21	7,62
	3Ni-4.18	5	72,95	15,34	78,51	5,05	33,45	7,48
<b>Mittelwert</b>		<b>63,76</b>	<b>9,28</b>	<b>60,52</b>	<b>5,40</b>	<b>26,21</b>	<b>5,02</b>	

	Klon	Zytokine, K IFN						
		n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
mit APZ	1Ni-4.17	3	87,81	18,49	69,20	18,66	34,30	
	1Ni-4.20	3	65,98		77,23		35,40	5,72
	1Ni-4.27	4	76,36	6,85	32,58		34,13	20,61
	1Ni-4.8	4	104,70		63,64	4,25	32,14	7,04
	2Ni-8.2	5	101,20	3,53	78,76	16,39	25,01	3,17
	4Ni-4.2	3	51,55	4,51	47,04	8,77	10,42	
	3Ni-4.13	9	47,68	6,99	66,72	8,36	48,03	9,40
	3Ni-4.18	2	85,80	65,44	63,94	26,61	42,07	15,32
<b>Mittelwert</b>		<b>77,63</b>	<b>7,04</b>	<b>62,39</b>	<b>5,13</b>	<b>32,69</b>	<b>3,73</b>	
ohne APZ	1Ni-4.17	3	15,88	6,48	16,12	2,04	13,08	
	1Ni-4.20	2	76,80		64,96		20,75	
	1Ni-4.27	4	62,41	24,88	33,82	10,16	1,73	
	1Ni-4.8	6	125,38	4,77	90,72	20,52	40,01	
	2Ni-8.2	4	76,17	27,70	31,30	9,38	14,92	
	4Ni-4.2	5	7,03	2,17	30,47	18,83	31,40	
	3Ni-4.13	6	65,14	7,89	45,49	10,29	26,85	

DATEN-ANHANG

	<b>3Ni-4.18</b>	5	50,06	12,85	51,60	7,17	23,22	
	<i>Mittelwert</i>		59,86	12,31	45,56	7,79	21,49	3,91

**Abb. 25**

Klon	Zytokine, K						
	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
1p1-4.2	1	n.d.		19,34		n.d.	
1p1-4.16	2	n.d.		5,28	1,69	n.d.	
1p1-4.30	3	n.d.		7,77	1,85	8,57	5,47
1p1-4.36	3	n.d.		9,88	0,63	n.d.	
1p1-4.1	4	133,35	8,87	33,07	4,55	47,60	5,71
1p1-4.12	4	386,64	38,33	65,33	8,88	81,30	18,78
1p1-4.44	4	125,31	7,49	n.d.		31,50	3,34
2p1-4.5	2						
<i>Mittelwert</i>		215,10	70,06	23,45	8,54	42,24	13,24

Klon	Zytokine, K IFN					
	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10
1p1-4.2	1	n.d.		35,86		n.d.
1p1-4.16	2	n.d.		11,17	6,22	n.d.
1p1-4.30	3	n.d.		11,99	0,89	1,84
1p1-4.36	3	n.d.		18,60	0,20	n.d.
1p1-4.1	4	180,32	20,88	28,40	2,21	47,14
1p1-4.12	4	540,50	96,08	54,20	9,89	81,14
1p1-4.44	4	129,13	4,64	n.d.		43,98
2p1-4.5	2	57,71	16,08	2,09	0,00	n.d.
<i>Mittelwert</i>		226,92	93,11	23,19	6,20	43,53

**Abb. 26**

A	Proliferation				
	n	K	SEM	K IFN	SEM
4Ni-4.106					
DZ	2	23,16	2,46	30,82	10,72
EBV	2	28,54	5,94	26,5	7,49

B	Zytokine, K						
	n	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
4Ni-4.106							
DZ	2	41,22	17,65	25,96	6,53	24,18	10,68
EBV	2	32,53	5,46	37,73	2,39	51,84	6,71

4Ni-4.106	Zytokine, K IFN					
	IFN	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
DZ	33,91	1,09	30,63	6,02	18,97	15,35
EBV	20,66	6,99	18,69	7,26	49,59	9,66

**Abb. 27**

A	Proliferation						
	Klon	n	K	SEM	n	K IFN	SEM
Kontrolle	4Ni-4.10	2	61,61	7,43	2	56,64	11,47
	4Ni-4.2	2	55,33	4,1	2	52	1,31
	4Ni-4.106	2	28,54	5,94	2	26,5	7,49
	<i>Mittelwert</i>		46,62	6,25		45,28	8,02
differenziert	4Ni-4.10	2	63,95	8,96	2	73,01	16,39
	4Ni-4.2	2	59	8,46	2	54,42	16,85
	4Ni-4.106	2	29,05	12,7	2	21,59	2,76
	<i>Mittelwert</i>		51,37	6,50		51,41	8,99

**B** | Zytokine, K

DATEN-ANHANG

	Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
Kontrolle	4Ni-4.10	2	72,59	5,04	61,42	10,71	37,73	5,87
	4Ni-4.2	2	65,52	2,72	46,67	7,03	46,88	19,39
	4Ni-4.106	2	32,53	5,46	37,73	2,39	51,84	6,71
	<i>Mittelwert</i>		<i>55,71</i>	<i>7,29</i>	<i>46,29</i>	<i>5,70</i>	<i>41,91</i>	<i>7,48</i>
differenziert	4Ni-4.10	2	62,05	25,45	46,33	17,08	28,79	0,72
	4Ni-4.2	2	66,5	10,04	44,54	16,83	21,89	7,76
	4Ni-4.106	2	42,02	20,49	45,42	1,55	54,16	4,16
	<i>Mittelwert</i>		<i>56,85</i>	<i>8,48</i>	<i>44,00</i>	<i>5,04</i>	<i>33,58</i>	<i>5,33</i>

		<i>Zytokine, K IFN</i>						
	Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
Kontrolle	4Ni-4.10	2	73,06	3,25	56,66	9,02	31,81	3,27
	4Ni-4.2	2	51,55	4,51	47,04	8,77	10,42	
	4Ni-4.106	2	20,66	6,99	18,69	7,26	49,59	9,66
	<i>Mittelwert</i>		<i>50,83</i>	<i>7,35</i>	<i>39,94</i>	<i>7,33</i>	<i>36,66</i>	<i>7,13</i>
differenziert	4Ni-4.10	2	58,97	33,53	53,09	25,97	23,51	0,55
	4Ni-4.2	2	35,97	19,83	32,22	13,29	20,3	8,39
	4Ni-4.106	2	22,64	2,61	26,79	11,08	55,93	3,91
	<i>Mittelwert</i>		<i>45,84</i>	<i>11,30</i>	<i>43,18</i>	<i>9,19</i>	<i>30,75</i>	<i>6,37</i>

Abb. 28

A		<i>Proliferation</i>					
	Klon	n	K	SEM	n	K IFN	SEM
autologe K	4Ni-4.10	3	61,61	7,43	3	56,64	11,47
	4Ni-4.2	3	55,33	4,1	3	52	1,31
	4Ni-4.106	3	28,54	5,94	3	26,5	7,49
	4Ni-4.38	2	66,12	1,99	2	52,91	12,8
	<i>Mittelwert</i>		<i>47,94</i>	<i>4,61</i>		<i>44,70</i>	<i>4,44</i>
heterologe K 3	4Ni-4.10	2	71,75	29,26	2	40,33	14,05
	4Ni-4.2	2	86,5	2,71	2	50,25	14,28
	4Ni-4.106	2	41,72	1,99	2	36,55	0,55
	4Ni-4.38	2	49,54	14,7	2	20,87	8,29
	<i>Mittelwert</i>		<i>62,38</i>	<i>8,56</i>		<i>37,00</i>	<i>5,35</i>
heterologe K 1	4Ni-4.10	1	35,53		1	28,42	
	4Ni-4.106	1	30,36		1	39,48	
	<i>Mittelwert</i>		<i>32,94</i>	<i>2,58</i>		<i>33,95</i>	<i>5,53</i>

B		<i>Zytokine, K</i>						
	Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
autologe K	4Ni-4.10	3	72,59	5,04	61,42	10,71	37,73	5,87
	4Ni-4.2	3	65,52	2,72	46,67	7,03	46,88	19,39
	4Ni-4.106	3	32,53	5,46	37,73	2,39	51,84	6,71
	4Ni-4.38	2	107,87	50,9	21,55	12,87	61,43	
	<i>Mittelwert</i>		<i>60,60</i>	<i>8,73</i>	<i>43,15</i>	<i>4,74</i>	<i>44,03</i>	<i>5,75</i>
heterologe K 3	4Ni-4.10	2	84,55	21,79	75,57	0	33,67	15,01
	4Ni-4.2	2	84,45	16,08	55,35	14,99	28,68	1,56
	4Ni-4.106	2	52,56	17,39	29,39	15,32	50,11	0,05
	4Ni-4.38	2	26,31	12,06	50,77	6,27	0,06	
	<i>Mittelwert</i>		<i>61,97</i>	<i>10,5</i>	<i>49,51</i>	<i>7,23</i>	<i>32,14</i>	<i>6,64</i>
heterologe K 1	4Ni-4.10	1	51,57		51,36		11,01	
	4Ni-4.106	1	28,13		7,83		42,25	
	<i>Mittelwert</i>		<i>39,85</i>	<i>11,7</i>	<i>29,60</i>	<i>21,8</i>	<i>26,63</i>	<i>15,6</i>

		<i>Zytokine, K IFN</i>						
	Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
autologe K	4Ni-4.10	3	73,06	3,25	56,66	9,02	31,81	3,27
	4Ni-4.2	3	51,55	4,51	47,04	8,77	10,42	
	4Ni-4.106	3	20,66	6,99	18,69	7,26	49,59	9,66
	4Ni-4.38	2	49,59	20,93	6,4	3,27	51,45	



DATEN-ANHANG

	<i>Mittelwert</i>		43,47	5,89	36,04	5,96	47,59	16,0
heterologe	<b>4Ni-4.10</b>	2	66,89	20,31	58,68	10,95	27,86	11,89
K	<b>4Ni-4.2</b>	2	52,83	7,31	37,34	19,35	9,08	0,99
3	<b>4Ni-4.106</b>	2	32,53	6,33	15,23	3,72	64,77	11,71
	<b>4Ni-4.38</b>	2	30,51	0	9,9	4,04	0,05	
	<i>Mittelwert</i>		47,86	7,22	30,29	7,95	29,07	9,85
heterologe	<b>4Ni-4.10</b>	1	40,64		44,04		6,47	
K	<b>4Ni-4.106</b>	1	38,03		12,44		63,79	
1	<i>Mittelwert</i>		39,34	1,31	28,24	15,8	35,13	28,7

**Abb. 29**

	<b>A</b>	<i>Proliferation</i>					
		<b>Klon</b>	<b>n</b>	<b>K</b>	<b>SEM</b>	<b>n</b>	<b>K IFN</b>
Kontrolle	<b>5Ni-4.10</b>	1	49,20		1	55,90	
	<b>5Ni-4.3</b>	1	66,10		1	86,73	
	<b>5Ni-4.7</b>	1	65,41		1	75,20	
	<b>5Ni-8.1</b>	1	46,96		1	52,62	
	<b>5Ni-8.8</b>	1	57,34		1	68,01	
	<b>5Ni-8.10</b>	1	25,15		1	42,32	
	<b>5Ni-8.11</b>	1	33,46		1	51,59	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	53,75		1	66,50	
	<i>Mittelwert</i>		49,67	4,78		62,36	4,78
PFA	<b>5Ni-4.10</b>	1	119,45		1	104,12	
	<b>5Ni-4.3</b>	1	133,67		1	156,94	
	<b>5Ni-4.7</b>	1	102,95		1	114,76	
	<b>5Ni-8.1</b>	1	101,19		1	91,38	
	<b>5Ni-8.8</b>	1	100,61		1	123,21	
	<b>5Ni-8.10</b>	1	129,84		1	142,93	
	<b>5Ni-8.11</b>	1	138,33		1	148,45	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	112,40		1	120,03	
	<i>Mittelwert</i>		117,30	5,06		125,23	7,49

	<b>B</b>	<i>Zytokine, K</i>							
		<b>Klon</b>	<b>n</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>SEM</b>	<b>IL-4</b>	<b>SEM</b>	<b>IL-10</b>	<b>SEM</b>
Kontrolle	<b>5Ni-4.10</b>	1				11,87		24,33	
	<b>5Ni-4.3</b>	1	291,88					22,43	
	<b>5Ni-4.7</b>	1				57,57		26,36	
	<b>5Ni-8.1</b>	1	20,43			21,45		8,29	
	<b>5Ni-8.8</b>	1				45,90		4,71	
	<b>5Ni-8.10</b>	1	12,96			4,42		2,44	
	<b>5Ni-8.11</b>	1	35,42			20,67		19,38	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	55,95			57,05		5,62	
	<i>Mittelwert</i>		83,33	47,09		31,27	7,66	14,19	3,26
PFA	<b>5Ni-4.10</b>	1	150,50			108,16		118,85	
	<b>5Ni-4.3</b>	1	138,80					130,14	
	<b>5Ni-4.7</b>	1				80,72		90,28	
	<b>5Ni-8.1</b>	1	98,14			90,59		95,74	
	<b>5Ni-8.8</b>	1				73,96		87,78	
	<b>5Ni-8.10</b>	1	58,52			49,14		115,83	
	<b>5Ni-8.11</b>	1	196,37			63,63		142,44	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	127,83			95,20		66,47	
	<i>Mittelwert</i>		128,36	17,49		80,2	6,99	103,61	9,11

	<b>Klon</b>	<i>Zytokine, K IFN</i>							
		<b>n</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>SEM</b>	<b>IL-4</b>	<b>SEM</b>	<b>IL-10</b>	<b>SEM</b>	
Kontrolle	<b>5Ni-4.10</b>	1	60,32			9,08		36,29	
	<b>5Ni-4.3</b>	1	625,92					41,19	
	<b>5Ni-4.7</b>	1				40,11		25,69	
	<b>5Ni-8.1</b>	1	36,60			34,13		10,42	
	<b>5Ni-8.8</b>	1				49,82		5,63	
	<b>5Ni-8.10</b>	1	33,56			5,25		7,23	

DATEN-ANHANG

	5Ni-8.11	1	83,84		24,70		40,94	
	5Ni-8.50	1	89,84		59,63		8,70	
	<i>Mittelwert</i>		<i>155,02</i>	<i>86,41</i>	<i>31,82</i>	<i>7,06</i>	<i>22,01</i>	<i>5,22</i>
PFA	5Ni-4.10	1	146,94		59,98		110,99	
	5Ni-4.3	1	201,02				136,15	
	5Ni-4.7	1			71,62		93,94	
	5Ni-8.1	1	51,37		87,57		61,67	
	5Ni-8.8	1			101,78		98,46	
	5Ni-8.10	1	35,52		42,15		91,77	
	5Ni-8.11	1	160,01		63,06		191,39	
	5Ni-8.50	1	79,64		94,12		75,71	
	<i>Mittelwert</i>		<i>112,42</i>	<i>24,73</i>	<i>76,99</i>	<i>7,68</i>	<i>107,51</i>	<i>13,40</i>

Abb. 30

A		Proliferation					
Klon	n	K	SEM	n	K IFN	SEM	
5Ni-4.10	5	164,19	23,5	5	157,4	35,54	
5Ni-4.3	3	136,01	46,29	3	171,78	21,69	
1Ni-4.20	3	83,26	29,85	3	107,41	41,28	
5Ni-4.63	3	84,61	28,48	3	100,31	27,54	
5Ni-4.65	1	109,48		1	111,71		
5Ni-8.1	3	152,7	31,74	3	171,7	23,15	
5Ni-8.7	3	171,65	28,71	3	188,97	16,51	
5Ni-8.8	2	49,57	38	2	125,91	4,63	
5Ni-8.9	3	147,26	26,48	3	173,9	16,07	
5Ni-8.10	2	61,51	28,42	2	146,54	11,02	
5Ni-8.11	3	83,17	14,79	3	106,3	10,28	
5Ni-8.50	2	169,86	75,5	2	171,87	59,36	
5Ni-8.52	1	144,02		1	151,6		
<i>Mittelwert</i>		<i>119,79</i>	<i>11,46</i>		<i>145,03</i>	<i>8,25</i>	

B		Zytokine, K					
Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
5Ni-4.10	5	n.d.		49,39	11,36	45,95	8,84
5Ni-4.3	3	44,96	21,79	51,38	20,51	43,81	14,54
1Ni-4.20	3	n.d.		43,65	17,65	20,62	6,3
5Ni-4.63	3	n.d.		38,29		22,07	6,46
5Ni-4.65	1	27,75		n.d.		14,18	
5Ni-8.1	3	36,19		52,69	13,55	28,71	8,48
5Ni-8.7	3	69,83	21,78	78,1	20,09	76,94	19,97
5Ni-8.8	2	85,86		35,07	28,52	7,7	3,96
5Ni-8.9	3	69,92	1,63	69,09	17,72	37,42	8,44
5Ni-8.10	2	62,75	35,51	13,9	3,9	9,21	0,36
5Ni-8.11	3	19,11	4,67	22,71	4,57	29,64	6,81
5Ni-8.50	2	41,45	13,18	68,64	27,3	24,08	20,5
5Ni-8.52	1	65,46		97,67		42,44	
<i>Mittelwert</i>		<i>48,91</i>	<i>6,71</i>	<i>51,72</i>	<i>6,56</i>	<i>30,98</i>	<i>4,99</i>

		Zytokine, K IFN					
Klon	n	IFN- $\gamma$	SEM	IL-4	SEM	IL-10	SEM
5Ni-4.10	5	n.d.		35,05	4,13	45,16	9,34
5Ni-4.3	3	66,59	24,47	56,24	16,83	73,08	2,35
1Ni-4.20	3	n.d.		54,94	17,18	37,2	9,74
5Ni-4.63	3	n.d.		20,49		25,01	10,89
5Ni-4.65	1	9,32		n.d.		13,63	
5Ni-8.1	3	59,55	15,06	71,34	7,45	42,93	9,23
5Ni-8.7	3	97,8	2,07	90,17	4,09	58,33	4,5
5Ni-8.8	2	80,66		44,25	22,56	4,46	0,61
5Ni-8.9	3	65,24	13,83	77,04	10,61	51,6	4,71
5Ni-8.10	2	98,9	11,57	23,05	6,93	32,47	8,35
5Ni-8.11	3	47,52	4,3	29,45	2,96	45,49	7,44

DATEN-ANHANG

<b>5Ni-8.50</b>	2	53,85	3,1	63,14	34,32	20,59	18,28
<b>5Ni-8.52</b>	1	65,66		103,33		49,01	
<b>Mittelwert</b>		62,25	7,63	55,71	7,05	38,38	5,05

**Abb. 31**

<b>A</b>	<b>n</b>	<b>KM-</b>	<b>SEM</b>	<b>KM+</b>	<b>SEM</b>		
<b>5Ni-4.3</b>	2	8711	437	15354	3624		
<b>5Ni-4.10</b>	1	4472		5796			
<b>5Ni-4.16</b>	2	4253	526	9644	2452		
<b>5Ni-8.1</b>	1	9235		13223			
<b>5Ni-8.9</b>	2	19466	5119	33511	4021		
<b>5Ni-8.10</b>	1	1103		2042			
<b>5Ni-4.20</b>	1	1992		2608			
<b>Mittelwert</b>		7033	2200	11740	3797		

<b>B, C, D</b>	<b>n</b>	<b>KM- IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>KM+ IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>KM- IL-4</b>	<b>IL-4</b>	<b>KM- IL-10</b>	<b>KM+ IL-10</b>
<b>5Ni-4.3</b>	2	620	600	318	125	536	474
<b>5Ni-4.10</b>	1	296	209			1526	958
<b>5Ni-4.16</b>	2	26	6	179	114	72	40
<b>5Ni-8.1</b>	1	1306	1790	1626	1339	453	409
<b>5Ni-8.9</b>	2	2553	2645	7779	7489	604	608
<b>5Ni-8.10</b>	1	477	315	5246	3894	354	235
<b>5Ni-4.20</b>	1			39	16	147	97
<b>Mittelwert</b>		879,5759 167	927,4050 833	2531,124 667	2162,935 917	527,4805 714	402,9347 857

**Abb. 32**

	<i>K</i> <i>Überstand</i>			<i>K IFN Überstand</i>		
	<b>IFN</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>	<b>IFN</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>
50 $\mu$ l Üst	7,23	7,95	9,8	24,21	26,61	69,22
25 $\mu$ l Üst	15,76	17,33	34,44	52,58	57,79	90,32
5 $\mu$ l Üst	54,56	59,97	95,57	70,01	76,94	84,72

**Abb. 34**

	<b>A</b>	<i>Proliferation</i>					
	<b>Klon</b>	<b>n</b>	<b>K</b>	<b>SEM</b>	<b>n</b>	<b>K IFN</b>	<b>SEM</b>
Kontrolle	<b>5Ni-4.16</b>	1	88,17		1	93,86	
	<b>5Ni-4.22</b>	1	89,79		1	59,95	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	44,03		1	36,57	
	<b>4Ni-4.10</b>	1			1	58,10	
	<b>1Ni-4.16</b>	1	43,19		1	38,06	
	<b>Mittelwert</b>		48,38	7,86		46,12	6,61
Transwell	<b>5Ni-4.16</b>	1	60,79		1	61,06	
	<b>5Ni-4.22</b>	1	65,57		1	49,68	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	70,91		1	56,12	
	<b>4Ni-4.10</b>	1			1	73,88	
	<b>1Ni-4.16</b>	1	22,65		1	23,86	
	<b>Mittelwert</b>		53,69	5,40		50,57	7,04

	<b>B</b>	<i>Zytokine, K</i>						
	<b>Klon</b>	<b>n</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>SEM</b>	<b>IL-4</b>	<b>SEM</b>	<b>IL-10</b>	<b>SEM</b>
Kontrolle	<b>5Ni-4.16</b>	1	141,11		210,57		105,44	
	<b>5Ni-4.22</b>	1	231,12		146,24		77,63	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	40,43		69,12			
	<b>4Ni-4.10</b>	1						
	<b>1Ni-4.16</b>	1						
	<b>Mittelwert</b>		92,28	40,49	44,11	5,21	68,50	6,91
Transwell	<b>5Ni-4.16</b>	1	152,87		241,97		95,61	

DATEN-ANHANG

	<b>5Ni-4.22</b>	1	180,54		57,35		54,30	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	88,73		76,72			
	<b>4Ni-4.10</b>	1						
	<b>1Ni-4.16</b>	1						
	<b>Mittelwert</b>		<i>109,47</i>	<i>20,55</i>	<i>39,64</i>	<i>8,49</i>	<i>50,60</i>	<i>3,67</i>

*Zytokine, K IFN*

	<b>Klon</b>	<b>n</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>SEM</b>	<b>IL-4</b>	<b>SEM</b>	<b>IL-10</b>	<b>SEM</b>
Kontrolle	<b>5Ni-4.16</b>	1	164,84		209,37		100,64	
	<b>5Ni-4.22</b>	1	195,68		70,31		21,61	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	20,93		61,35			
	<b>4Ni-4.10</b>	1						
	<b>1Ni-4.16</b>	1						
	<b>Mittelwert</b>			<i>76,59</i>	<i>35,17</i>	<i>43,52</i>	<i>5,84</i>	<i>60,64</i>
Transwell	<b>5Ni-4.16</b>	1	155,85		206,24		103,23	
	<b>5Ni-4.22</b>	1	219,40		43,97		41,96	
	<b>5Ni-8.50</b>	1	35,85		86,22			
	<b>4Ni-4.10</b>	1						
	<b>1Ni-4.16</b>	1						
	<b>Mittelwert</b>		<i>98,16</i>	<i>35,70</i>	<i>44,30</i>	<i>7,45</i>	<i>60,74</i>	<i>13,50</i>