

Chemokine regulieren den entzündlichen Phänotyp der atopischen Dermatitis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Gombert

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ruzicka / Prof. Dr. Bernhard Homey

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 24.1.2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey betreut.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Dermato-Immunologischen und Onkologischen Labor in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreiche Betreuung und großzügige Unterstützung meiner Arbeit und im Besonderen für die ungezählten Anregungen, Denkanstöße und Diskussionen sowie für seine gründliche und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Frank Wunderlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung.

Herrn Sven Teuber danke ich für die gründliche und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Albert Zlotnik, Lajos Kemeny, Harri Alenius, Antti Lauerma, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Andor Pivarcsi, Ludivine Da Cunha, Sari Lehtimäki, Andrea Koreck und Christophe Caux danke ich für viele anregende Ideen, Diskussionen und Kritik im Rahmen des EU-Projektes QLK4-CT-2001-00366, ohne die diese Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Kollegen Franziska Winterberg, Micaela Hesterberg, Petra Franken-Kunkel, Ulrike Wiesner, Eniko Sonkoly, Juliane Rieker, Erich Bünemann, Robert Kubitzka und Stephan Meller für ihre Unterstützung.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Pivarcsi, A., M. Gombert, M. C. Dieu-Nosjean, A. Lauerma, R. Kubitza, S. Meller, J. Rieker, A. Muller, L. Da Cunha, A. Haahtela, E. Sonkoly, W. H. Fridman, H. Alenius, L. Kemeny, T. Ruzicka, A. Zlotnik und B. Homey (2004). "CC Chemokine Ligand 18, An Atopic Dermatitis-Associated and Dendritic Cell-Derived Chemokine, Is Regulated by Staphylococcal Products and Allergen Exposure." J Immunol **173**(9): 5810-7.

Gombert, M., Dieu-Nosjean, M.C., Winterberg, F., Bünemann, E., Kubitza, R. C., Da Cunha, L., Haahtela, A., Lehtimäki, S., Rieker, J., Meller, S., Pivarcsi, A., Koreck, A., Fridman, W.-H., Zentgraf, H.-W., Pavenstädt, H., Amara, A., Caux, C., Kemeny, L., Alenius, H., Lauerma, A., Ruzicka, T., Zlotnik, A. und Homey, B. (2004). CCL1-CCR8 Interactions: An Axis Mediating the Recruitment of T Cells and Langerhans-Type Dendritic Cells to Atopic Skin Inflammation. J Immunol, submitted

Gombert, M., Müller, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Winterberg, F., Bünemann, E., Kubitza, R.C., Haahtela, A., Lehtimäki, S., Rieker, J., Meller, S., Pivarcsi, A., Kemeny, L., Alenius, H., Lauerma, A., Ruzicka, T., Zlotnik, A. und B. Homey (2004). CCL26 but not CCL24 or CCL11 is the most atopic dermatitis related Chemokine within the Eotaxin-Family. JACI, in preparation

1	EINLEITUNG	2
1.1	ATOPISCHE DERMATITIS.....	2
1.2	ATOPISCHE DERMATITIS UND DAS IMMUNSYSTEM.....	2
1.3	CHEMOKINE	2
1.4	CHEMOKINE UND IHRE ROLLE IN ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN DER HAUT	2
1.5	FRAGESTELLUNG.....	2
2	MATERIAL UND METHODEN	2
2.1	PATIENTEN.....	2
2.1.1	<i>Patienten.....</i>	<i>2</i>
2.1.2	<i>Atopie-Patch-Test.....</i>	<i>2</i>
2.1.3	<i>Staphylococcus Enterotoxin B-Patch-Test</i>	<i>2</i>
2.1.4	<i>Mechanische Hautreizung.....</i>	<i>2</i>
2.2	ANTIKÖRPER	2
2.2.1	<i>Antikörper für Durchflußzytometrie.....</i>	<i>2</i>
2.2.2	<i>Antikörper für Immunhistochemie.....</i>	<i>2</i>
2.3	LÖSUNGEN UND PUFFER	2
2.4	ZELLKULTUR.....	2
2.4.1	<i>Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC).....</i>	<i>2</i>
2.4.2	<i>Isolation von T-Zellen.....</i>	<i>2</i>
2.4.3	<i>Isolation von Monozyten.....</i>	<i>2</i>
2.4.4	<i>Generierung von interstitiellen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen</i>	<i>2</i>
2.4.5	<i>Aktivierung von Monozyten, interstitiellen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen.....</i>	<i>2</i>
2.4.6	<i>Einzelzellsuspension aus Hautproben.....</i>	<i>2</i>
2.4.7	<i>Transwell-Chemotaxisassay</i>	<i>2</i>
2.4.8	<i>DC-Migration</i>	<i>2</i>
2.4.9	<i>Analytische Durchflußzytometrie (FACS)</i>	<i>2</i>
2.5	HISTOLOGIE	2
2.5.1	<i>Immunohistochemie</i>	<i>2</i>
2.5.2	<i>Zytospin-Präparate.....</i>	<i>2</i>

2.6	NUKLEINSÄUREN-ANALYSE.....	2
2.6.1	<i>Gewebe-Homogenisierung.....</i>	2
2.6.2	<i>RNA-Extraktion.....</i>	2
2.6.3	<i>Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung.....</i>	2
2.6.4	<i>Reverse-Transcription-PCR</i>	2
2.6.5	<i>Quantitative real-time PCR.....</i>	2
2.7	DATENANALYSE.....	2
2.7.1	<i>Statistik.....</i>	2
2.7.2	<i>Shrunken-Centroid Analyse</i>	2
2.7.3	<i>Diagramme.....</i>	2
3	ERGEBNISSE.....	2
3.1	ENTZÜNDLICHE ERKRANKUNGEN DER HAUT – EIN MOLEKULARBIOLOGISCHER VERGLEICH	2
3.2	CCL1	2
3.2.1	<i>CCL1 ist ein inflammatorisches Chemokin, das spezifisch mit Entzündungen in atopischer Haut assoziiert ist.....</i>	2
3.2.2	<i>Inflammatorische Zytokine und mikrobielle Produkte regulieren die Expression von CCL1.....</i>	2
3.2.3	<i>Bindung und Kreuzvernetzung von IgE induziert CCL1 in Mastzellen ..</i>	2
3.2.4	<i>Allergenkontakt induziert die Produktion von CCL1 in Patienten mit atopischer Dermatitis.....</i>	2
3.2.5	<i>T-Zell-Subpopulationen, Monozyten und Subpopulationen dendritischer Zellen exprimieren CCR8.</i>	2
3.2.6	<i>Die Expression von CCR8 wird während der frühen Differenzierung dendritischer Zellen und bei Aktivierung beibehalten</i>	2
3.2.7	<i>Das inflammatorische Chemokin CCL1 zeigt zusammen mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12 synergetische Effekte bei der Rekrutierung von CCR8⁺ T-Zellen und dendritischen Zellen.....</i>	2
3.3	CCL18.....	2
3.3.1	<i>Erhöhte Expression von CCL18 in der Haut ist mit dem Phänotyp der atopischen Dermatitis assoziiert.....</i>	2
3.3.2	<i>Mikrobielle Produkte von Staphylococcus aureus induzieren CCL18-Produktion in vitro.</i>	2

3.3.3	<i>Allergen- und Superantigenexposition induzieren CCL18-Expression in vivo.</i>	2
3.4	CCL26	2
3.4.1	<i>CCL26 stellt ein Atopie-assoziiertes Mitglied der Eotaxin-Familie dar...</i>	2
4	DISKUSSION	2
4.1	CCL1	2
4.2	CCL18	2
4.3	CCL26	2
5	ZUSAMMENFASSUNG	2
6	LEBENS LAUF	2
7	LITERATURVERZEICHNIS	2

Abkürzungsverzeichnis

A

Ab	Antibody, Antikörper
AD	Atopische Dermatitis

B

BSA	Rinderserum-Albumin, bovine serum albumin
-----	---

C

CD	Cluster of determination
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CCL	C-Chemokin Ligand
CCR	C-Chemokin Rezeptor
CI	Chemotaxis-Index
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen, kutanes Lymphozytenantigen
ConA	Concavalin A
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor

D

Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (s. DNS)
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxy-Ribonucleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

F

Fab	Antibody binding Fragment, antikörperbindendes Fragment
FACS	Fluorescence activated cell sorter / Fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum / fötales Rinderserum
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum / fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

G

g	Gramm
GPCR	G-Protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor

H

h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin

HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	Human histocompatibility antigen
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell / humane Nabelschnur Endothelzelle

I

ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin

K

kg	Kilogramm
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

L

LC	Langerhans-Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipotechoic acid

M

mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic activated cell sorter / Magnet-aktivierter Zellsortierer
MC	Macrophage
MEM	Minimal essential medium
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

N

ND	Not determined / nicht bestimmt
----	---------------------------------

O

OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin

P

p	Probability / Wahrscheinlichkeit
pAb	Polyclonal Antibody/ polyklonaler Antikörper
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell / Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion

PGN	Peptidoglycan
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol Mistirat Acetat

R

RNA	Ribonucleic-Acid (s. RNS)
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Rotations per minute /Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RU	Relative Unit / Relative Einheit

S

s	Sekunde
SD	Standard deviation / Standardabweichung
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B

T

TAMRA	5- (und6)-Carboxytetramethylrhodamin
TCR	T-cell receptor / T-Zell Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor / Tumor Nekrosefaktor
TSLP	Thymic stromal Lymphopoietin

V

VCAM	Vascular cell adhesion molecule
------	---------------------------------

1 Einleitung

1.1 Atopische Dermatitis

Atopische Dermatitis, abgeleitet vom griechischen *atopia*, was andersartig, unpassend bedeutet (Spergel *et al.*, 2003), auch atopisches Ekzem oder Neurodermitis, ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Haut (Abbildung 1), die mit kutaner Hyperreaktivität gegen Umwelteinflüsse einhergeht, die für nichtatopische Individuen unschädlich sind (Leung *et al.*, 2003). Obwohl es Beschreibungen der atopischen Dermatitis gibt, die bis ins Jahr 1800 zurückreichen, existiert bis heute kein einheitlicher Labortest für atopische Dermatitis. Die Diagnose basiert auf einer Reihe klinischer Befunde, die 1980 von Hanifin und Rajka zusammengestellt wurden und bis heute weltweit Verwendung finden, unter anderem Juckreiz, Ekzeme an Gesicht und Extremitäten bei Kindern und Jugendlichen, flexurale Ekzeme bei Erwachsenen sowie dem chronischen Charakter der Dermatitis (Hanifin *et al.*, 1980). Die Prävalenz der atopischen Dermatitis liegt zwischen 10-20% bei Kindern und 1-3% bei Erwachsenen. In Industrieländern hat die Prävalenz in den letzten beiden Jahrzehnten eine Verdopplung bis Verdreifachung erlebt, bleibt jedoch weit geringer in Ländern mit ländlichen, von Ackerbau geprägten Gebieten (Leung *et al.*, 2004).

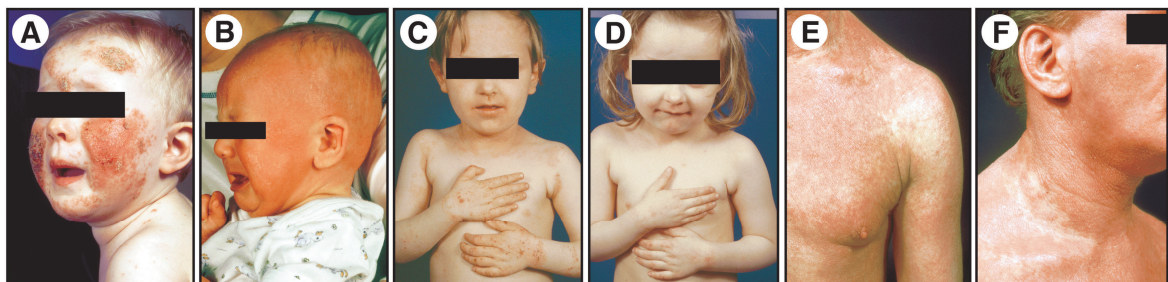


Abbildung 1: Hautläsionen der atopischen Dermatitis bei Säuglingen (A, B), Kindern (C, D) und Erwachsenen (E, F).

Einer Studie zufolge benötigt ein Patient mit atopischer Dermatitis im Monat 14 Stunden zur Versorgung seiner Erkrankung. Damit entsteht bei 1,5 Millionen Atopikern in Deutschland, inklusive der Behandlungskosten, ein

volkswirtschaftlicher Schaden in Höhe von 325 Mrd. US\$ - etwa 390 Mrd. Euro pro Jahr, wovon allein 226 Millionen US\$ (271 Mil. €) auf Ausgaben für Glukokortikosteroide (Verboom *et al.*, 2002) entfallen.

Als Auslöser der atopischen Dermatitis werden mehrere Faktoren diskutiert. So induzieren Nahrungsmittelallergene in 40% der Kinder mit mittlerer bis schwerer atopischer Dermatitis Hautläsionen (Sampson, 1999). Kinder und Jugendliche mit Nahrungsmittelallergien haben in der Regel positive Hauttests oder Serum IgE-Spiegel für verschiedene Nahrungsmittel, häufig Eier, Milch, Weizen, Soja oder Erdnüsse (Lever *et al.*, 1998).

Bei sensibilisierten Patienten kommt es vor, dass Juckreiz und Hautläsionen nach intranasaler oder bronchialer Inhalation von Aeroallergenen auftreten (Tupker *et al.*, 1996). Durch epikutane Applikation von Aeroallergenen, wie Hausstaubmilben, Gräsern, Hautschuppen von Tieren oder Schimmelpilzen, lassen sich in 30-50% der Patienten mit atopischer Dermatitis ekzematöse Reaktionen provozieren, was bei gesunden Freiwilligen nicht möglich ist (Leung *et al.*, 2003). Dabei ist insbesondere der Kontakt zu Hausstaubmilben-Antigenen im täglichen Leben kaum vermeidbar. Dabei kann eine atopische Reaktion sowohl durch kutanen Antigenkontakt, als auch durch Einatmen von Hausstaubmilben-Allergen induziert werden (Tupker *et al.*, 1996).

Ein weiterer Auslöser der Dermatitis ist *Staphylococcus aureus*, mit dem über 90% der atopischen Hautläsionen besiedelt sind. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass der klinische Verlauf der atopischen Dermatitis bei Patienten, die mit Antibiotika gegen Staphylokokken und Glukokortikosteroiden behandelt werden, besser abläuft als bei Patienten, die nur mit Glukokortikosteroiden behandelt werden. *S. aureus* sezerniert Superantigene, die in der Lage sind, Hautläsionen auszulösen und gegen die spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Leung *et al.*, 2003).

In der atopischen Haut liegt eine verringerte Keramid-Konzentration vor. Daraus resultiert eine chronisch trockene Haut mit einer eingeschränkten Barrierefunktion (Imokawa, 2001). Kommt es zu einem regelmäßigen Kratzen bei den Patienten,

so wird die Barrierefunktion der Haut weiter eingeschränkt. Darüber hinaus existieren Studien, die belegen, dass Kratzen, Schwitzen und Stress Auslösefaktoren der atopischen Dermatitis darstellen (Ostlere *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2003).

1.2 Atopische Dermatitis und das Immunsystem

In den letzten Jahren zeigt sich eine zunehmende klinische und experimentelle Evidenz, die auf eine zentrale Rolle hautinfiltrierender T-Zellen in der Pathogenese der atopischen Dermatitis hinweist (Ruzicka *et al.*, 1997; Woodward *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2003). Immunohistochemisch findet sich ein mononukleäres Zellinfiltrat (Abbildung 2), welches sich aus hautinfiltrierenden CLA⁺-Lymphozyten und monozytären Zellen (Makrophagen und dendritischen Zellen) zusammensetzt (Leung *et al.*, 2003).

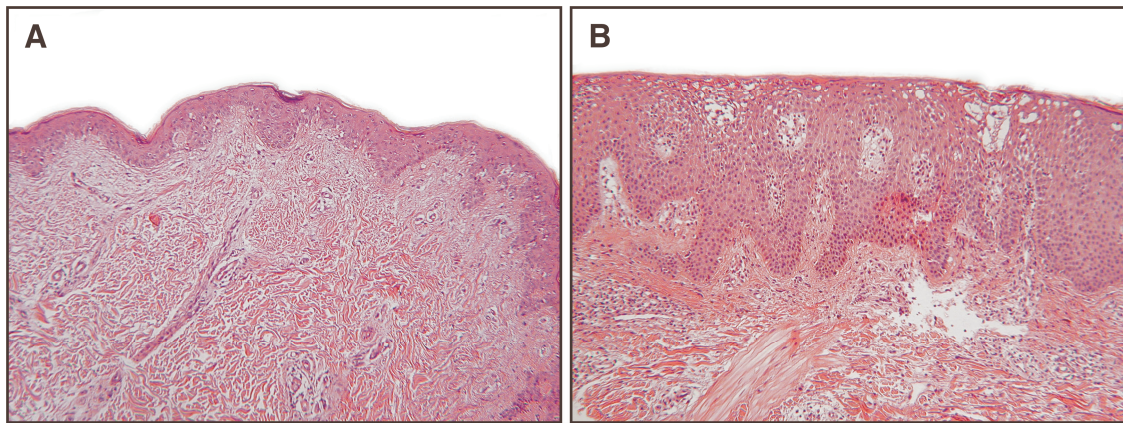


Abbildung 2: H&E Färbung normaler Haut (A) aus der Knie-Region und läsionaler atopischer Haut (B) aus dem Rücken eines Atopie-Patienten. Auffällig in der läsionalen Haut (B) sind die verdickte Epidermis, die elongierten Rete-Leisten, große Mengen an inflammatorischem Infiltrat sowohl perivaskulär als auch intraepidermal. 250x Vergrößerung.

Während ein Großteil der Patienten mit atopischer Dermatitis von Eosinophilie – erhöhten Anzahlen an Eosinophilen im Blut – betroffen ist (Leung *et al.*, 2003), finden sich intakte Eosinophile sehr selten, von ihnen abgeleitete Proteine jedoch häufig in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (Homey *et al.*, 1999). Akute Läsionen weisen eine Dominanz an Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 auf,

die T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2) zugeordnet werden, während chronisch lichenifizierte Läsionen eine Dominanz des T_H1 Zytokins $IFN-\gamma$ aufweisen (Grewe *et al.*, 1994; Grewe *et al.*, 1995; Werfel *et al.*, 1996; Grewe *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 2003). Die Differenziertheit der Zytokinexpression während akuter bzw. chronischer Phasen der atopischen Dermatitis suggeriert die Präsenz unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen. Dermale Endothelzellen im Bereich atopischer Läsionen zeigen eine erhöhte Expression an Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, vaskulärem Adhäsions-Molekül (VCAM-1) und dem intrazellulärem Adhäsionsmolekül (ICAM-1) (Leung *et al.*, 2003).

Betrachtet man die Fraktion der antigenpräsentierenden Zellen, so weist die Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis in den läsionalen Bereichen eine erhöhte Anzahl an IgE-tragenden Langerhans-Zellen sowie inflammatorischen epidermalen dendritischen Zellen auf, die einen hochaffinen IgE-Rezeptor tragen (Novak *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang tragen IgE-Rezeptoren zum Festhalten und Internalisieren von Allergenen bei, bevor diese prozessiert und an T-Zellen in der atopischen Haut präsentiert werden können. IgE-Rezeptor-positive Langerhans-Zellen sind zudem in der Lage, in die Lymphknoten zu wandern und dort naive T-Zellen zu stimulieren. Die klinische Bedeutung dieser Zellen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Langerhans-Zellen mit einem hochaffinen IgE-Rezeptor präsent sein müssen, um durch Aeroallergenkontakt Hautekzeme in Patienten mit atopischer Dermatitis hervorrufen zu können (Langeveld-Wildschut *et al.*, 2000).

Es existieren Belege, dass Allergene eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der atopischen Dermatitis einnehmen. Während 20 - 30% der Patienten keine erhöhten Serum-IgE Werte aufweisen (intrinsische Form), finden sich bei 70 - 80% der AD-Patienten erhöhte Serum-IgE Werte (extrinsische Form) (Leung *et al.*, 2004) sowie antigenspezifische IgE-Antikörper gegen Milben-, Pollen oder Nahrungsmittelantigene. Zusätzlich finden sich antigenspezifische T-Zellen in läsionaler Haut von Atopikern. „Atopie-Patch-Tests“, bei denen ein Pflaster mit einer Finn-Kammer zur Antigen-Exposition auf den Patienten aufgeklebt wird, weisen zudem darauf hin, dass auch die epikutane Exposition mit

Protein/Peptidantigenen für die Pathogenese der atopischen Dermatitis ausschlaggebend ist (Leung *et al.*, 2003).

Ein mögliches Modell der AD gestaltet sich wie folgt: Zu Beginn gelangt ein Antigen über eine epikutane Exposition oder alternativ über den Blutweg in die Haut und kommt dort in Kontakt mit dendritischen Zellen, welche sich in der Haut von Atopikern in erhöhter Anzahl finden, und die einen hoch- und niederaffinen Rezeptor für IgE (Fcε RI und II) auf ihrer Oberfläche tragen. Dendritische Zellen können so allergenspezifische IgE-Antikörper binden, infolge des Antigenkontaktes aktiviert werden und in lokal ableitende Lymphknoten einwandern. Dort kommt es durch Zell-Zell Interaktionen mit T-Zellen zu einer Aktivierung allergenspezifischer T-Zellen, welche daraufhin in aktiviertem Zustand die sekundären lymphoiden Organe verlassen und nach Rezirkulation im Blutgefäßsystem in die antigenbelastete Haut einwandern, wo es zu einem neuerlichen Antigenkontakt und in dessen Folge zur Ausschüttung von Effektorzytokinen kommt, die zur Ausbildung einer typischen Läsion der atopischen Dermatitis beitragen.

Einige Schritte der Signalkaskaden, die zu Hautläsionen in der atopischen Dermatitis führen, sind bereits gut verstanden und durch Studien belegt. Aspekte wie das hautspezifische Wanderungsverhalten von CLA⁺ Gedächtnis-T-Zellen in die Haut und Faktoren, welche die Migration von dendritischen Zellen kontrollieren sind bis dato weitgehend unklar.

Die Interaktion von Chemokinliganden mit spezifischen Rezeptoren auf T-Zellen und dendritischen Zellen stellt einen viel versprechenden Erklärungsansatz in Bezug auf diese offenen Fragen in der Pathogenese der atopischen Dermatitis dar.

1.3 Chemokine

Die Mitglieder der Chemokinsuperfamilie sind lösliche, zytokinähnliche Proteine mit einer Größe von 8-12 kDa. Durch Interaktion mit G-Protein-gekoppelten

Rezeptoren kontrollieren sie das Migrationsverhalten von Leukozyten (Homey *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000). Daneben besitzen die Chemokine weitere kritische biologische Funktionen, darunter Steuerungsfunktionen in der Migration von Stammzellen bei Zebrafischen (*Danio rerio*) (David *et al.*, 2002; Knaut *et al.*, 2003) oder während der Metastasierung von Brusttumoren (Muller *et al.*, 2001). Strukturhomologien innerhalb der Chemokinsuperfamilie und dem Zugriff auf „Expression Sequence Tags“- (EST)-Datenbanken und bioinformatische Werkzeuge ist es zu verdanken, dass die Chemokinsuperfamilie eine der ersten humanen Proteinfamilien darstellt, die vollständig kloniert und kartiert ist (Zlotnik *et al.*, 2000).

Während der „Entdeckungsphase“ der Chemokine kam es gehäuft vor, dass mehrere Arbeitsgruppen in kurzen Zeitabständen identische neue Chemokine unter verschiedenen Namen veröffentlichten. Um den daraus resultierenden „Dschungel“ an Trivialnamen und Synonymen zu lichten, wurden die Mitglieder der Chemokinsuperfamilie nach einer molekularen Besonderheit neu benannt. Chemokine besitzen in ihrer Aminosäure-Sequenz vier konservierte Cysteine. Anhand der Position der ersten beiden Cysteine lassen sich vier Unterfamilien unterscheiden – erstens die CC-Familie, deren ersten beiden Cysteine sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, zweitens die CXC-Familie, zwischen deren ersten Cysteinen sich eine Nicht-Cystein-Aminosäure befindet, drittens die C-Chemokine, deren erstes Cystein einzeln steht und viertens die CX₃C-Familie, deren erste Cysteine von drei Nicht-Cystein-Aminosäuren getrennt sind (Abbildung 3) (Zlotnik *et al.*, 2000).

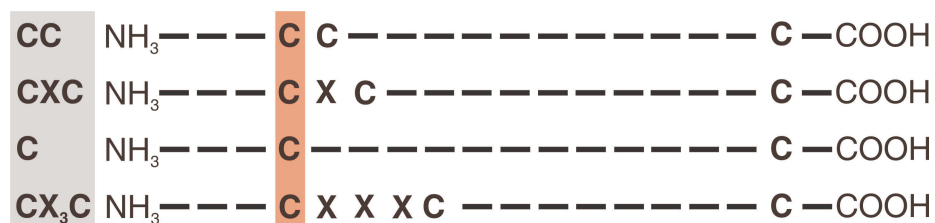


Abbildung 3: Aminosäuren-Sequenz der Chemokinsuperfamilie. Basierend auf der Abfolge der ersten beiden Cysteine in der Aminosäuresequenz werden die vier Chemokinfamilien voneinander abgegrenzt.

Die Einführung der systematischen Nomenklatur (Tabelle 1) die auf der Keystone-Konferenz 1999 etabliert wurde, hilft nun, die zur Zeit bekannten 45 humanen Chemokine und 18 Rezeptoren sowie 31 murine Chemokine zu ordnen (Homey *et al.*, 1999; Zlotnik *et al.*, 2000).

Tabelle 1: Systematische Nomenklatur für Chemokine (Keystone Meeting on chemokines, 1999).

CC Chemokin / Rezeptor Familie			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptor(en)</i>
CCL1	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	MCP-1, MCAF	MCP-1, JE	CCR2, CCR5
CCL3	MIP-1 α , LD78 α , LD78 β , AT464.1, AT464.2, GOS19-1, GOS19-2	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β , AT744.1, AT744.2, Act-2, G-26, HC21, H400, LAG-1	MIP-1 β	CCR1, CCR5, CCR8
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR4, CCR5
CCL6	Unbekannt	C10, MRP-1	
CCL7	MCP-3	NC28, FIC, MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2, HC14	MCP-2	CCR2, CCR3
CCL9/10	Unbekannt	MRP-2, CCF18, MIP-1 γ	Unbekannt
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	Unbekannt	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4, NCC-1, CK β -10	Unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1, HCC-3, NCC-2	Unbekannt	CCR1
CCL15	HCC-2, MIP-1 δ , NCC-3, MIP-5, Lkn-1	Unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4, NCC-4, LEC, LMC	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC, dendrokinine	TARC	CCR4, CCR8
CCL18	DC-CK1, PARC, MIP-4, AMAC-1	Unbekannt	Unbekannt
CCL19	MIP-3 β , ELC, exodus-3, Ck β 11	MIP-3 β	CCR7
CCL20	MIP-3 α , LARC, exodus-1,	MIP-3 α	CCR6
CCL21	6CKine, SLC, exodus-2, TCA-4	6CKine	CCR7
CCL22	MDC, STCP-1, DCtactin- β	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1, MIP-3, CK β 8, CK β 8-1	Unbekannt	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck β -6	Unbekannt	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9 (GPR9-6)
CCL26	Eotaxin-3, TMKine	Unbekannt	CCR3
CCL27	CTACK, ALP	CTACK, ALP	CCR10
CCL28	CCL28, MEC	CCL28	CCR10
CXC Chemokin / Rezeptor Familie			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptor(en)</i>
CXCL1	GRO-1, GRO α , MGSA- α	GRO/KC	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	GRO2, GRO β , MIP-2 α , MGSA- β	GRO/KC	CXCR2
CXCL3	GRO3, GRO γ , MIP-2 β	GRO/KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4var1, PF4alt	Unbekannt
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	Unbekannt	CXCR2
CXCL8	IL-8, MDNCF, NAP-1, NCF	Unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig, Humig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	crg-2, mob-1	CXCR3
CXCL11	I-TAC, H174, b-R1	Unbekannt	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , PBSF	SDF-1 α/β	CXCR4
CXCL13	BLC, BCA-1,	BLR1L, Angie	CXCR5
CXCL14	BRAK, bolekinine	BRAK	Unbekannt
CXCL15	Unbekannt	Lungkine	Unbekannt
CXCL16	CXCL16	CXCL16	CXCR6 (STRL33)
C Chemokin / Rezeptor Familie			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptor</i>
XCL1	Lymphotactin, SCM-1 α , ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	SCM-1 β		XCR1
CX3C Chemokin / Rezeptor Familie			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptor</i>
CX3CL1	Fractalkine, neurotactin	Fractalkine	CX3CR1

Vermittelt werden die biologischen Effekte der Chemokine durch Interaktion mit heptahelikalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Homey *et al.*, 1999; Zlotnik *et al.*, 2000; Maghazachi, 2003). Wie auch ihre Liganden, zeigte die Familie der Chemokinrezeptoren in den letzten Jahren eine bemerkenswerte Expansion. Zurzeit sind 10 CC-, 6 CXC und je ein XC- sowie CX3C-Rezeptor bekannt (Tabelle 1). Ausgehend von einer Chemokin-Rezeptor-Interaktion starten eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die in Apoptose, Genexpression, Chemotaxis, Integrinaktivierung oder Rezeptorinternalisierung enden (Abbildung 4) (Homey *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000).

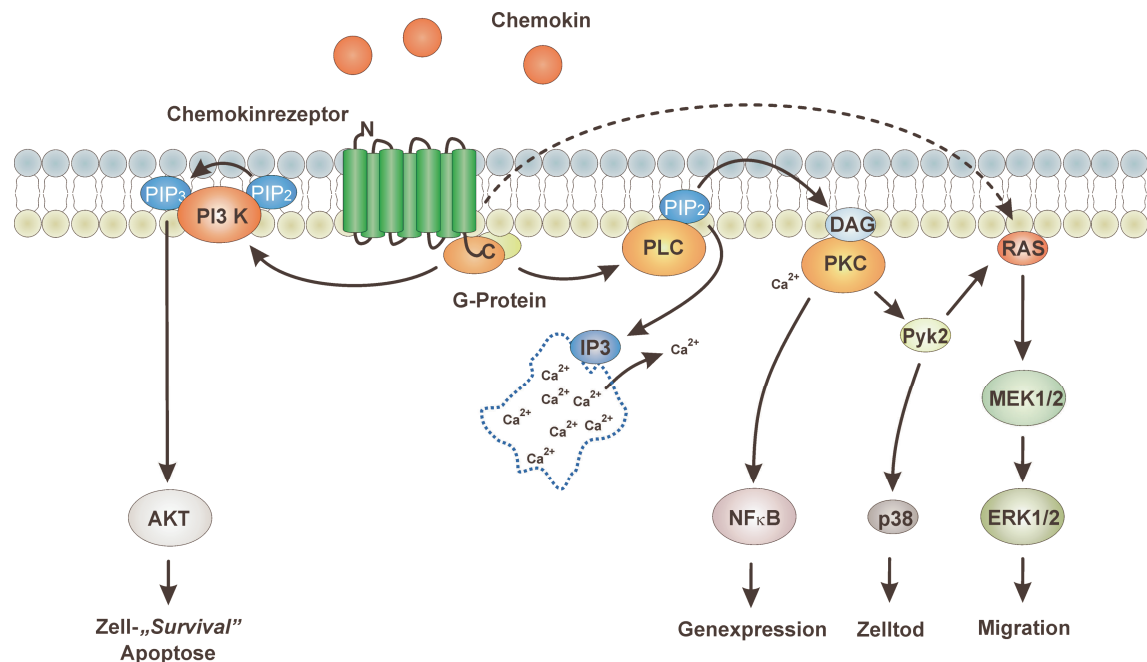


Abbildung 4: Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren. Chemokinrezeptoren besitzen sieben Transmembran-Domänen und sind G-Protein gekoppelt. Sie vermitteln verschiedene biologische Funktionen, darunter Genexpression, Chemotaxis, Adhäsion, Apoptose, Integrinaktivierung und Rezeptorinternalisierung.

Nach weiteren Chemokinrezeptoren wird zurzeit intensiv geforscht, wobei verwaiste („orphan“), GPCRs im Mittelpunkt der Forschung stehen.

Innerhalb der Chemokinsuperfamilie existiert ein Grad an Promiskuität bezüglich der Liganden-Rezeptor-Interaktion. So kommt es vor, dass mehrere Liganden ihre biologische Funktion über denselben Rezeptor vermitteln. Gruppiert man die

Liganden nach ihrer chromosomalen Lage und ihren korrespondierenden Rezeptoren, so fallen einige „Cluster“-Chemokine auf, die sowohl chromosomal gleich angeordnet sind, als auch identische Rezeptoren binden. Eine kleine Anzahl „Non-Cluster“-Chemokine besitzen spezifische Rezeptoren und in der Regel eine besondere chromosomale Lokalisation (Abbildung 5) (Zlotnik *et al.*, 2000).

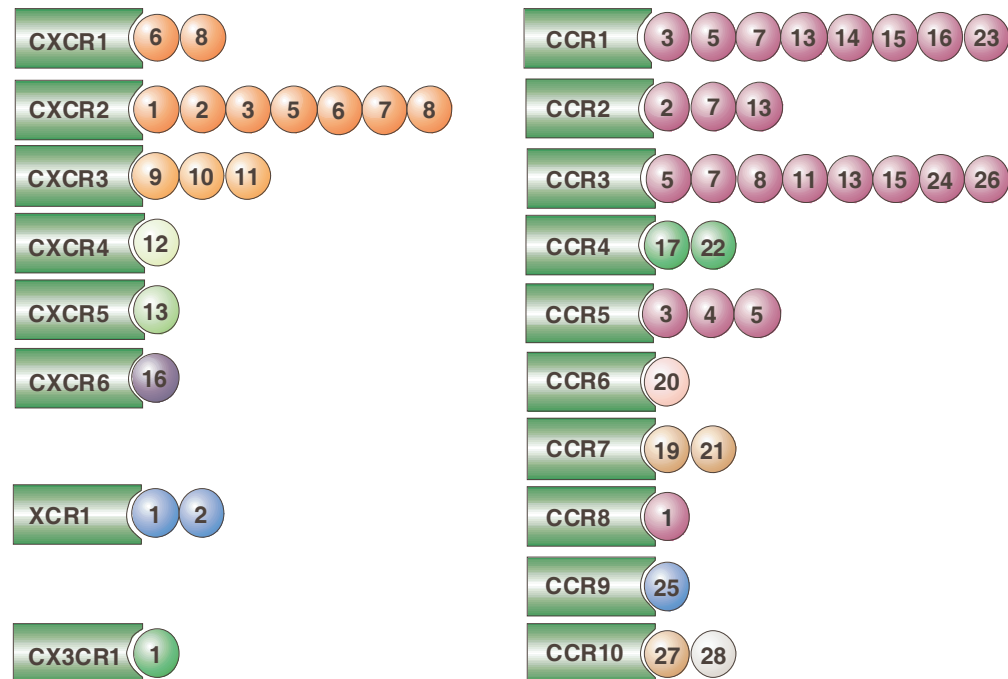


Abbildung 5: „Cluster“- versus „Non-Cluster“-Chemokine. Das Schema stellt die Rezeptor-Liganden-Interaktionen sowie die chromosomale Lokalisation von Chemokinen dar (rot = 4q12-q13, orange = 4q21.21, gelb = 10q11.1, violett = 17q11.2, rosa = 2q33-q37, hellblau = 1q23, dunkelblau = 19p13.2, hellgrün = 4q21, grün = 16q13, braun = 9p13, grau = 5p13). Es können Liganden, die identische chromosomale Lage aufweisen („Cluster“) und Liganden in spezifischer chromosomaler Lokalisation („Non-Cluster“) unterschieden werden.

Der Umfang und die vollständige Bekanntheit der Chemokinsuperfamilie und großer Teile ihrer Rezeptoren bietet so erstmals die Gelegenheit, umfassend erkrankungsassoziierte Chemokine im Kontext der Pathogenese der atopischen Dermatitis zu identifizieren und ihre Funktion zu untersuchen.

1.4 Chemokine und ihre Rolle in entzündlichen Erkrankungen der Haut

Die Migration von Leukozyten stellt eine essentielle Funktion des Immunsystems dar, welche die Integrität des menschlichen Organismus aufrechterhält. So wandern dendritische Zellen und T-Zellen als Wächter des Immunsystems zwischen peripheren und lymphatischen Organen, erkennen Fremdartigene und induzieren Immunantworten, um Infektionen und maligne Zell-Transformationen zu kontrollieren. Ebenso sind sie Auslöser und Bestandteil fehlgeleiteter Immunreaktionen, die zu Entzündungen und Autoimmunreaktionen in peripheren Organen führen. Subpopulationen von Gedächtnis-T-Zellen zeigen ein festes Migrationsverhalten. So wandern $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-positive T-Zellen bevorzugt in die Mucosa des Gastrointestinaltraktes (Butcher *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000). Zellen hingegen, die durch das „cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA) charakterisiert sind, weisen ein spezifisches Migrationsverhalten in die Haut auf (Picker *et al.*, 1990). Dies zeigt sich in der Lokalisation dieser Zellen - im peripheren Blut finden sich 5-15% CLA⁺ T-Zellen, in entzündeten Organen (ohne Haut) weniger als 10%, während ihr Anteil in entzündeter Haut 80-95% beträgt (Picker *et al.*, 1990). CLA interagiert mit seinem vaskulären Liganden E-Selektin. E-Selektin ist jedoch keineswegs hautspezifisch, sondern findet sich vielerorts auf aktiviertem Endothel, so dass es das hautspezifische Wanderungsverhalten allein nicht zu erklären vermag. In den letzten Jahren hat sich daher folgendes Modell entwickelt, welches die Migration von Leukozyten aus dem Blut in peripheres Gewebe zu erklärt (Abbildung 6): Im Verlauf ihrer Wanderung schweben die Leukozyten zunächst im Blutgefäß, bis sie mit oberflächengebundenen Kohlehydratlignanden an Selektine andocken und an der Gefäßwand entlang rollen (rollende Adhäsion). Diese sehr lockere Bindung reicht noch nicht aus, um eine Zelle trotz des Blutstromes an eine Gefäßwand zu binden, ist jedoch stark genug, um ein Rollen der Zelle entlang der Gefäßwand – und damit intensivere Zell-Zell Kontakte – zu ermöglichen. Dabei interagieren die Leukozyten mit an das Gefäßendothel gebundenen Chemokinen und Integrinen, so dass es zu einer festen Adhäsion an die Gefäßwand kommt. Die feste Adhäsion und Chemokinaktivierung sind Voraussetzung für die nachfolgende Diapedese, einer

transendothelialen Migration, welche die Zelle aus dem Gefäß in perivaskuläre Areale führt. Dort angelangt, wandern die Leukozyten entlang von festen, an Moleküle der extrazellulären Matrix gebundenen Chemokingradienten an den Ort der Entzündung. Für dieses Modell - und damit für eine entscheidende Rolle von Chemokinen in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Haut - sprechen Veröffentlichungen der letzten Jahre, in denen die Rekrutierung von T-Zellen in die Haut durch Interaktionen zwischen CCL27 und CCR10 (Homey *et al.*, 2002), von Neutrophilen und Monozyten nach kutaner CCL3/*Mip1* α -Injektion (Lee *et al.*, 2000) und von dendritischen Zellen (Caux *et al.*, 2000) gezeigt werden konnten.

CCL17/*TARC*, dessen Rezeptor CCR4 sich auf zirkulierenden hautinfiltrierenden T-Zellen findet, wird auf kutanen Venolen präsentiert, wo es die Rekrutierung von T-Zellen als Auslöser einer festen Bindung, dem Arrest an die Gefäßwand, unterstützt (Reiss *et al.*, 2001). Kürzlich konnte gar gezeigt werden, dass CCL17 im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis hochreguliert ist und mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Kakinuma *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2004).

In der Psoriasis zeigt CCL20/*MIP-3* α eine Assoziation mit dem psoriatischen Phänotyp (Homey *et al.*, 2000). CCL20 vermittelt dabei die Chemotaxis von T-Zellen und Subpopulationen dendritischer Zellen (Dieu *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1999; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Homey *et al.*, 2000). Bei der Betrachtung dendritischer Zellen zeigte sich, dass diese in „unreifen“ Zustand große Mengen CCR6 auf ihrer Oberfläche tragen, „reife“ dendritische Zellen CCR6 herunterregulieren und statt dessen CCR7 exprimieren (Caux *et al.*, 2000). Diese und weitere Befunde in Chemokin- oder chemokinrezeptordefizitären Mäusen führten zu einem Modell, dass davon ausgeht, dass CCR6 eine Rolle für die Rekrutierung von Vorläufern dendritischer Zellen in die Haut spielt (Caux *et al.*, 2000). Nach ihrer Aktivierung und Differenzierung in den peripheren Organen regulieren dendritische Zellen CCR6 herunter und CCR7 herauf und wandern nun in CCL21/*6Ckine* exprimierende Gefäße um von dort zu den drainierende Lymphknoten zu gelangen, um dort relevante Antigene an T-Zellen zu präsentieren (Vanbervliet *et al.*, 2002). Darüber hinaus gehend lockt CCL20 präferenziell Gedächtnis-T-Zellen an. In der läsionalen Haut von Psoriatikern wird

CCL20 von Keratinozyten exprimiert, die sich in unmittelbarer anatomischer Nähe zu den CCR6-tragenden Gedächtnis-T-Zellen befinden (Homey *et al.*, 2000). *In vitro* gelang es zu zeigen, dass CCL20 in strukturellen Zellen der Haut, wie Keratinozyten und Endothelzellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren IL-1, TNF- α oder T-Zell Botenstoffen wie IFN- γ , IL-17 und CD40L hochreguliert wird. Da IL-1, TNF- α und IL-17 in psoriatischen Läsionen verstärkt vorkommt, suggeriert dies, dass CCL20 eine wichtige Rolle in der Unterhaltung des Entzündungsprozesses in der Psoriasis spielt (Homey *et al.*, 2000).

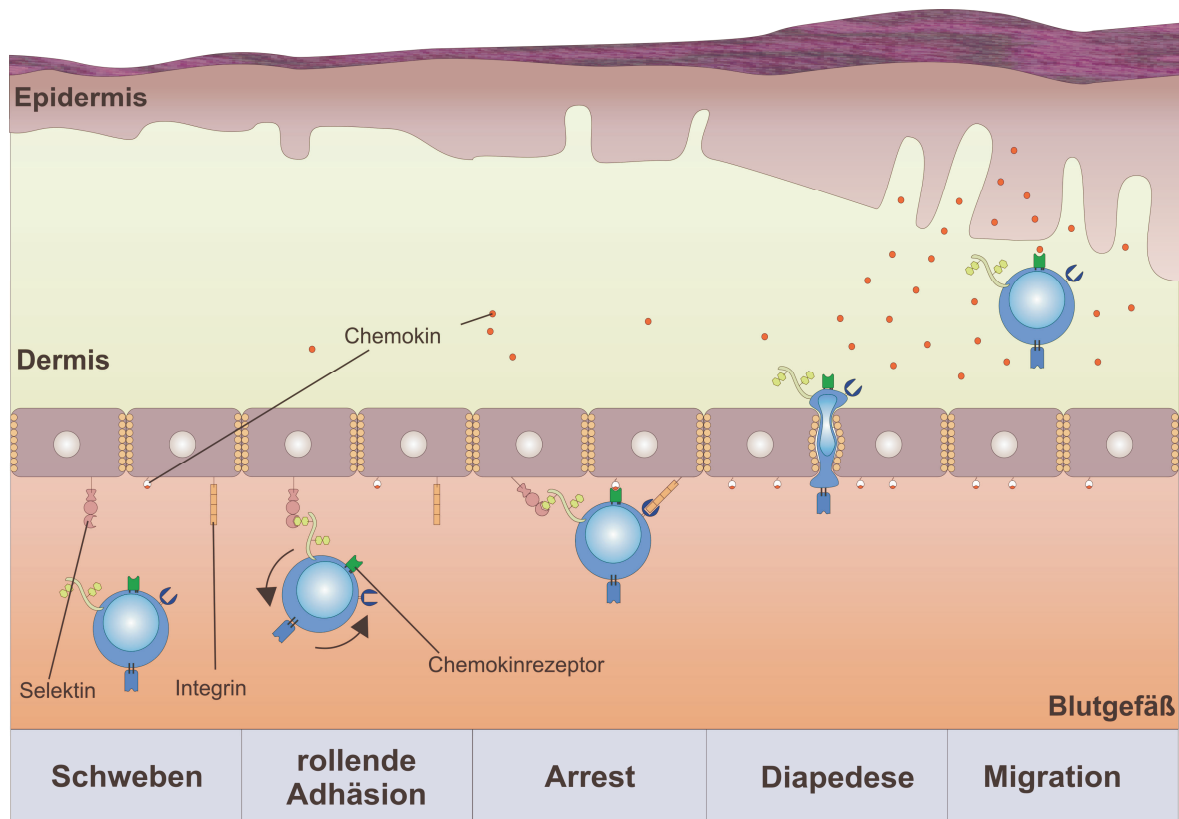


Abbildung 6: Einwanderung von Leukozyten in die Dermis. Im Verlauf der Wanderung aktivierter Leukozyten schweben diese zunächst im Blutgefäßsystem, rollen schließlich aufgrund der Interaktion mit Selektinen entlang dem Gefäßendothel (rollende Adhäsion), bis sie mit spezifischen Rezeptoren Chemokine binden, die Integrinrezeptoren auf der Leukozytenoberfläche aktivieren bis es zu einer festen Adhäsion an das Gefäßendothel (Arrest) kommt. Eine feste Adhäsion und Chemokinaktivierung sind Voraussetzungen für die nachfolgende transendotheliale Migration aus dem Blutgefäß in perivaskuläre Areale (Diapedese). Dort bilden matrixgebundene Chemokine stabile Gradienten, welche die anatomische Lokalisation von Leukozytensubpopulationen in den peripheren Geweben bestimmen. Abbildung in Anlehnung an: (Homey *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002)

In Bezug auf CXCL8/*IL-8* konnte eine Studie zeigen, dass humane Keratinozyten eine Hochregulation von CXCL8 zeigten, nachdem sie mit Kulturüberständen einer T_H1-Kultur stimuliert worden waren (Albanesi *et al.*, 2001). Giustizieri *et al.* berichten, dass CXCL8 in Keratinozyten von Patienten mit Psoriasis konstitutiv exprimiert wird und durch TNF- α und IFN- γ hochreguliert werden konnte (Giustizieri *et al.*, 2001). CXCR1 und CXCR2, die Rezeptoren für CXCL8 finden sich auf Neutrophilen, T-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Endothelzellen und Keratinozyten (Kemeny *et al.*, 1994).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Chemokine in entzündlichen Erkrankungen der Haut häufig sehr spezifisch reguliert werden und wichtige Funktionen, im Besonderen im Bereich der Chemotaxis innehaben.

1.5 Fragestellung

Chemokine besitzen wichtige Funktionen als Mediatoren der Zellmigration, Entwicklungsbiologie und Metastasierung. Aufgabe des EU-geförderten Projektes QLRK4-CT-2001-00366, „The Role of Chemokines in the Pathogenesis of Atopic Eczema“ ist es, einen umfassenden Überblick über die Expression aller bekannten Chemokine in der humanen atopischen Dermatitis sowie einem Mausmodell zu bekommen, die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren in einem Mausmodell zu untersuchen, sowie die Regulation der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren durch externe und intrinsische Auslösefaktoren zu untersuchen.

Als ein Teil dieses Projektes war es Ziel dieser Arbeit, diejenigen Chemokine zu identifizieren, die im Vergleich mit normaler Haut und anderen entzündlichen Erkrankungen der Haut mit der atopischen Dermatitis assoziiert sind. Soweit möglich sollte für diese Chemokine zudem geklärt werden, welche Rolle sie in der Initiation und Amplifikation von atopischen Hautläsionen spielen. Welche Zellpopulationen werden von Atopie-assoziierten Chemokinen rekrutiert? Wie werden diese Chemokine reguliert? Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Faktoren, welche die Atopie-assoziierten Chemokine regulieren, wie Antigenkontakt, Staphylokokkenbesiedlung, mechanische Hautreizungen und Zytokine.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patienten

Die Studie erfolgte mit Zustimmung der jeweils zuständigen Ethikkommissionen. Hautbiopsien und Blutproben von Patienten wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung entweder von gesunden Donoren oder von Patienten mit atopischer Dermatitis, Psoriasis oder Lupus erythematoses entnommen. „Buffy coats“ wurden von der Blutbank der Uniklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Atopie-Patch-Test

Der Atopie-Patch-Test wurde mit einer Hausstaubmilben-Mixtur durchgeführt, die 10% *Dermatophagoides farinae* und 10% *Dermatophagoides pteronyssinus* enthielt (Dermatophagoidesmix 20%, Chemotechnique, Malmö, Schweden). Für die Applikation des Hausstaubmilben-Mixes wurden große Finn-Kammern (Epitest, Hyrylä, Finnland) benutzt. Aus einer Gruppe von 17 Atopie-Patienten, die nach den Kriterien von Hanifin und Rajka (Hanifin *et al.*, 1980) ausgesucht wurden, wurden 10, die ein positives Prick-Test-Ergebnis aufwiesen, in die Studie einbezogen. Nach einer Expositionszeit von 2, 6 und 48 Stunden wurden aus den drei Test-Arealen sowie aus gesunder Rückenhaut je eine 6 mm Biopsie gestanzt. Die Biopsien wurden in je zwei Teile geteilt und zur weiteren Verwendung in Immunohistochemie und quantitativer real-time PCR bei -70°C gelagert. Alle 10 Patienten wiesen eine positive Reaktion auf den Patch-Test auf, ein Kontrolltest mit Petrolatum war bei allen Patienten negativ.

2.1.3 Staphylococcus Enterotoxin B-Patch-Test

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) wurde in einer Konzentration von 0,226 µg/µl in 0,9% NaCl-Lösung in kleinen Finn-Kammern (Epitest Ltd., Hyrylä, Finnland) auf gesund wirkende Rückenhaut von AD-Patienten aufgebracht, die wie oben

beschrieben selektiert wurden. Insgesamt wurden 9 Patienten untersucht. Pro Patient wurden je drei Pflaster für 2, 6 und 48 Stunden appliziert. Nach der Applikation wurden aus allen drei Patch-Arealen und einem Bereich mit gesunder Rückenhaut 6 mm Biopsien gestanzt. Die Biopsien wurden in zwei Teile geteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.4 Mechanische Hautreizung

Um eine Juckreiz-induzierte Kratzeffekte auf die Haut von Atopikern zu untersuchen, wurden 10 gesunde Probanden und 10 AD-Patienten rekrutiert, die wie unter Atopie-Patch-Test beschrieben ausgesucht wurden. Diesen Hautspendern wurde ein Klebstreifen (Scotch-Tape, 3M, Neuss) 20mal aufgeklebt und wieder abgezogen, um eine standardisierte oberflächliche Verletzung der Haut zu erreichen. Nach 6 und 24 Stunden wurde aus dem behandelten Areal und aus gesund wirkender Rückenhaut je eine 6 mm Biopsie gestanzt. Die Biopsien wurden in je zwei Teile geteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2 Antikörper

2.2.1 Antikörper für Durchflußzytometrie

Tabelle 2: Antikörper für Durchflußzytometrie.

Antikörper	Konjugat	Isotype	Menge [µl]	Färbedauer [min]	Klone	Bestellnr	Hersteller
CD4	FITC	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T4	555346	BD Biosciences
	PE	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T4	555347	BD Biosciences
	Cy-Chrome	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T4	555348	BD Biosciences
	APC	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T4	555349	BD Biosciences
CD8	FITC	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T8	555366	BD Biosciences
	PE	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T8	555367	BD Biosciences
	Cy-Chrome	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T8	555368	BD Biosciences
	APC	Maus IgG ₁	5	30	RPA-T8	555369	BD Biosciences
CD14	PE	Maus IgG _{2a}	5	30	M5E2	555397	BD Biosciences

	APC	Mouse IgG _{2a}	5	30	M5E2	555399	BD Biosciences
CD19	FITC	Mouse IgG ₁	5	30	HIB19	555412	BD Biosciences
	PE	Mouse IgG ₁	5	30	HIB19	555413	BD Biosciences
	Cy-Chrome	Mouse IgG ₁	5	30	HIB19	555414	BD Biosciences
CCR3	PE	Ratte IgG _{2a}	10	30	61828	FAB155P	R&D Systems
CCR8	--	Ziege IgG	1,2	45	polyklonal	ALX-210-764	Alexis Biochemicals
	FITC	Ratte IgG _{2b}	10	30	191704	FAB1942F	R&D Systems
	PE	Ratte IgG _{2b}	10	30	191704	FAB1942P	R&D Systems
CLA	FITC	Ratte IgM	7	30	HECA-452	555947	Pharmingen
Schwein α-Ziege	PE	Schwein IgG	5	15	polyklonal	G50004	Caltag
Isotypen:							
Maus IgG1	FITC	--	--	--	--	IC002F	R&D Systems
	PE	--	--	--	--	555749	BD Biosciences
	Cy-Chrome	--	--	--	--	33818x	BD Biosciences
	APC	--	--	--	--	554681	BD Biosciences
Maus IgG2a	PE	--	--	--	--	IC003P	R&D Systems
	APC	--	--	--	--	555576	BD Biosciences
Ratte IgG2b	PE	--	--	--	--	SC-2873	Santa Cruz
Ratte IgM	FITC	--	--	--	--	553942	BD Biosciences
Goat IgG	--	--	--	--	--		Jackson Immuno.

2.2.2 Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 3: Antikörper für Immunohistochemie.

Antikörper	Konzentration [ug/ml]	Färbedauer	Isotype	Bestellnr.	Hersteller
CCL1	15	100 min, 27°C	Ziege IgG	sc-1412	R&D Systems
CCL18	25	100 min, 28°C	Ziege IgG	AF 394	R&D Systems
CCL11	20	110 min, 37°C	Ziege IgG	sc-6181	Santa Cruz Biotech.
CCL24	15	2h, RT	Ziege IgG	sc-12253	Santa Cruz Biotech.

CCL26	10	100 min, 37°C	Ziege IgG	sc-19353	Santa Cruz Biotech.
CXCL12	5	4hRT + ÜN 4°C	Maus IgG ₁	-	¹
CCR8	1:10 verd.	2h RT	Maus IgG	-	²
CCR3	20	90 min, 37°C 0,0025% Saponin	Ziege IgG	sc-6225	Santa Cruz Biotech.
Isotypen					
Maus IgG₁				DAK-G01	DAKO Cytomation
Maus IgG				DAK-G01	DAKO Cytomation
Ziege IgG				005-000-003	Jackson Immuno.

2.3 Lösungen und Puffer

C-Puffer	30 ml RPMI, 0,5g BSA, 500 µl HEPES-Puffer, sterilfiltriert, ÜN bei 37°C, 5% CO ₂ im Brutschrank equilibriert.
PBS -Puffer (1x):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 0,15 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O, pH 7,2-7,4
FACS-Puffer	PBS supplementiert mit 1% BSA oder FCS und 0,01% Natriumazid.
MACS-Puffer	PBS supplementiert mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA

2.4 Zellkultur

2.4.1 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Blut aus Heparin-Blutentnahmeröhrchen oder „buffy coat“-Präparaten aus der örtlichen Blutbank wurde 1:1 mit RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe) verdünnt und auf ¼ Volumen Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gegeben. Die Leukozytenfraktion wurde durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (RT, 20 min, 1000 rpm, deaktivierte Zentrifugen-

¹ Der Antikörper gegen CXCL12 wurde freundlicherweise von Ali Amara, Unite d'Immunologie Virale, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, Frankreich zur Verfügung gestellt.

² Der Antikörper gegen CCR8 wurde freundlicherweise von Hermann Pavenstädt, Universität Freiburg, Abteilung für Nephrologie, zur Verfügung gestellt.

bremse, Heraeus Minifuge T mit Rotor #2250) gewonnen. Das wolkige Zellmaterial oberhalb der Interphase („buffy coat“) wurde abpipettiert und einmal in PBS gewaschen. Zur Erythrozytenlyse wurde entweder ein Erythrozytenlyse-Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Protokoll des Herstellers benutzt oder durch Zugabe von 25 ml sterilem Wasser für 30 Sekunden lysiert und mit einem Volumen sterilgefiltertem 2x PBS neutralisiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI wurden die PBMCs für weitere Versuche verwendet oder in TRIZOL aufgenommen und für RNA-Extraktion weiter benutzt.

2.4.2 Isolation von T-Zellen

T-Zellen wurden unter Verwendung von „Human T Cell Enrichment Columns“ (R&D Systems) aus zuvor gewonnenen PBMCs nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.4.3 Isolation von Monozyten

Monozyten wurden mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) aus zuvor gewonnenen PBMCs aufgereinigt. Dazu wurden die 10^7 Zellen/80µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 µl CD14 Microbeads für 15 min bei 6-12°C inkubiert. Die einmal in 10 Volumen MACS-Puffer gewaschenen Zellen wurden anschließend über eine zuvor mit MACS-Puffer gespülte MACS-Säule aufgereinigt. Alle Komponenten der Monozytenaufreinigung stammten von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland.

2.4.4 Generierung von interstitiellen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen

PBMCs wurden wie oben beschrieben nach der Ficoll-Paque Dichtegradienten-Methode aufgereinigt. Eine Verbesserung der Aufreinigung wurde durch eine weitere Zentrifugation mit einem 52% Percoll-Gradienten erzielt. Als letzter

Reinigungsschritt erfolgte eine negative Selektion mit einem Monozyten-Isolations-Kit (Monocyte isolation kit) und MACS-Säulen nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). Die isolierten Monozyten wurden 6 Tage lang mit GM-CSF und IL-4 zur Generierung von dendritischen Zellen vom interstitiellen Typ (Sallusto *et al.*, 1994) kultiviert. Zur Generierung von Langerhans-Zellen wurde zusätzlich in den beiden letzten Tagen TGF- β 1 und TNF- α zugegeben. Zur Charakterisierung der LCs wurden monoklonale Antikörper gegen CD207/Langerin (DC-GM4, Immunotech, Marseille, Frankreich) und E-Cadherin (HECD-1, Takara) benutzt. Die Generierung der dendritischen Zellen wurde in Kooperation durch Marie-Caroline Dieu-Nosjean am INSERM U255, Paris durchgeführt.

2.4.5 Aktivierung von Monozyten, interstitiellen dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen.

Die verwendeten Zellen wurden vor Versuchsbeginn dreimal gewaschen und zusammen mit LPS (25 mg/ml), LTA (Lipotechoic acid) aus *Staphylococcus aureus* (10 μ g/ml), Peptidoglycan (PGN) aus *S. aureus* (10 μ g/ml), Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* (10 μ g/ml), dem Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) aus *S. aureus* (10 ng/ml) oder unbehandelt für 6 und 24 Stunden kultiviert (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Frankreich). Zusätzlich wurde ein Ansatz mit murinen CD40L-transfizierten Fibroblasten (1 CD40L Zelle/5 DCs) (Garrone *et al.*, 1995) kultiviert. Die CD40L-transfizierte Zelllinie, die auch zur Stimulation während des Reifungsprozesses der dendritischen Zellen verwendet wurde, wurde freundlicherweise vom Schering-Plough Labor in Dardilly, Frankreich, zur Verfügung gestellt. Nach 6 und 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellen in TRIZOL (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) geerntet, um nachfolgend Analysen mittels ELISA und quantitativer real-time PCR durchführen zu können. Der Aktivierungszustand der dendritischen Zellen wurde mit den folgenden monoklonalen Antikörpern per Durchflußzytometrie validiert: anti-CD83 (HB15a, Immunotech), anti-CD40

(MAB89, Immunotech) und anti-HLA-DR (L243, Becton Dickinson, San Jose, CA).

2.4.6 Einzelzellsuspension aus Hautproben

Die Generierung von Einzelzellen aus menschlicher Haut wurde in Anlehnung an Benyon et al. durchgeführt (Benyon *et al.*, 1986). Vorhäute aus Zirkumzisionen oder Hautproben aus 6 mm Biopsien wurden unmittelbar nach ihrer operativen Entfernung in RPMI aufgenommen. Mit Hilfe einer sterilen Schere oder zwei sterilen Skalpelln wurden die einzelnen Proben mechanisch in möglichst kleine Stücke zerkleinert und zweimal mit HBSS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen. Die Fragmente wurden 1 Stunde lang in RPMI, supplementiert mit 1,5 mg/ml Kollagenase Typ I und Hyaluronidase Typ I (beides Sigma, Seelze, Deutschland), bei 37°C, 5% CO₂ in befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Die Fragmente wurden mehrfach auf- und abpipettiert und über einen Cell Strainer (100 µm, BD Falcon, San Jose, USA) gefiltert. Mit unverdaulichem Gewebe wurde der enzymatische Verdau wiederholt, die vereinzelter Zellen wurden 2x mit Medium gewaschen.

2.4.7 Transwell-Chemotaxisassay

Um Chemokin-induzierte Chemotaxis zu untersuchen, wurden die Migrationsversuche in Transwell-Platten mit Einsätzen mit einer Porengröße von 3 µm (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) durchgeführt, deren Böden mit Sigmacote (Sigma) beschichtet wurden, um ein Anhaften der Zellen zu verhindern. Chemokine oder Kontrollen wurden in 600 µl C-Puffer in die einzelnen Kammern vorgelegt, bevor 10⁶ Zellen in 100 µl C-Puffer in die obere Kammer gegeben wurden. Die Migrationszeit für T-Zellen, PBMCs oder Monozyten betrug 3 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und befeuchteter Luft. Nach Migration wurden jedem Ansatz zwecks Normierung 50000 Microbeads mit einem mittleren Durchmesser von ca. 15 µm (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA) hinzugefügt. Anschließend wurden die migrierter Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Tabelle 2) gefärbt und mit Hilfe der analytischen Durchflußzytometrie

ausgewertet. Die prozentuale Migration wurde abschließend des Verhältnisses Zellen pro Microbead im Vergleich zu einer Startpopulation mit 10^6 Zellen ausgewertet.

2.4.8 DC-Migration

Für die am INSERM U255 in Paris durchgeführte Migration dendritischer Zellen und Langerhans-Zellen wurde 48-Well Microchamber-Platten (48-well Boyden microchamber, Neuroprobe, Pleasanton, CA) nach einem zuvor beschriebenes Protokoll benutzt (Dieu-Nosjean *et al.*, 2001). Dabei wurden die eingesetzten Chemokine verdünnt und in den unteren Kammern vorgelegt. Anschließend wurden 10^5 Zellen in 60 μ l Medium in die obere Kammer gegeben. Die Kammern wurden durch einen Polykarbonatfilter mit einer Porengröße von 5 μ m getrennt. Nach einer Stunde bei 37°C, 5% CO₂ und befeuchteter Atmosphäre wurden die Filter gefärbt und die Zellen mit Hilfe eines Mikroskops (20x Vergrößerung) ausgezählt. Alle Assays wurden als Doppelbestimmung ausgeführt.

2.4.9 Analytische Durchflußzytometrie (FACS)

Zur Validierung von Oberflächenmarkern mittels analytischer Durchflußzytometrie wurden die zu untersuchenden Zellen in FACS-Röhrchen gegeben (Falcon 2052, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) und zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (10 min., 1200 rpm, 4°C, Hettich 1302 mit Rotor #1323). Bei Zellpopulationen, auf denen Fc-Rezeptoren vorkamen, wurde ein Absättigungsschritt dieser mit 50 μ l humanem Serum für 20 min bei 4°C durchgeführt und ein weiteres Mal gewaschen. Anschließend erfolgte die eigentliche Färbung mit den primären Antikörpern, gefolgt von zwei Waschschritten und der Färbung mit den sekundären Antikörpern. Die Färbezeiten und Mengen an Antikörpern finden sich in der Antikörpertabelle (Tabelle 2). Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 150 μ l PBS mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Zu jeder Färbung wurde eine Isotypkontrolle mit gleicher

Konzentration und gleichen Färbebedingungen mitgeführt. Die Fluoreszenzanalyse, die mit FITC-, PE-, CyChrome- (PE-Cy5) und APC-gekoppelten Antikörpern durchgeführt wurde, erfolgte mit einem Durchflußzytometer vom Typ FACScan oder FACScalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Pro Messung wurden mindestens 25000 Zellen – oder, im Falle der Migrationsversuche, so viele wie möglich – untersucht. In der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurde durch das Setzen eines ‚Gates‘ auf relevante, lebende Leukozytenpopulationen fokussiert. Um CLA⁺-Zellen in einem Leukozyten-Gate weiter zu analysieren, wurde zusätzlich ein Gate um die CLA⁺-Population gelegt und mittels der logischen AND Verknüpfung mit dem Leukozyten-Gate für weitere Analysen selektiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der CellQuest Software der Firma Becton Dickinson.

2.5 Histologie

2.5.1 Immunohistochemie

Für immunohistochemische Analyse wurden tiefgefrorene Hautproben, welche auf einem Kryomikrotom auf eine Dicke von 8 µM geschnitten und auf Superfrost plus-Objektträger (Microm International GmbH, Walldorf) aufgebracht wurden, oder Zytospin-Material (s. Kap. 2.5.2) verwendet. Die Präparate wurden in Aceton fixiert und mit H₂O₂ vorbehandelt, um eine vorhandene Peroxidase-Aktivität zu beseitigen. Anschließend folgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einem Avidin/Biotin Blocking Kit (VECTOR Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Zur Färbung wurden jeweils spezifische Antikörper gegen das nachzuweisende Protein benutzt (s. Tabelle 3). Zusätzlich wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt, welche der gleichen Spezies und Immunglobulingattung angehörte wie der Primärantikörper der Färbung. Als Zweitantikörper wurden streptavidingekoppelte Zweitantikörper gegen die jeweils verwendete Immunglobulingattung des Erstantikörpers aus Vectastain ABC-Kits oder Vector Elite Kits verwendet. Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit einem AEC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Nach einer Gegenfärbung mit

Hämatoxylin (20 s) wurde mit gesättigter Lithiumcarbonat-Lösung (beides Sigma) kontrastiert. Abschließend wurden die Schnitte mit AEC-erhaltendem Eindeckelmedium (Mounting Medium for AEC Cat. No. 1479, Immunotech, Marseille, Frankreich) eingedeckelt oder mit eindeckelfreiem Medium (Crystal/Mount™ Biomedica Corp., Foster City, CA, USA) abgedeckt. Alle Bilder wurden an einem Leitz Orthoplan-Mikroskop mit einer Olympus Camedia C-4040 Digitalkamera aufgenommen. Um die Schwankungen dieser semi-professionellen Kamera zu kompensieren, wurde mit Adobe Photoshop 7 eine manuelle Tonwertkorrektur durchgeführt, um einen einheitlichen Bildhintergrund und eine gute Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten.

2.5.2 Zytospin-Präparate

Zytospin-Präparate erlauben die immunohistochemische Färbung von Zellen, die normalerweise in Suspensionen oder unter nichtadhärenten Kulturbedingungen vorkommen. Dazu wurden 10^5 Zellen pro Präparat mit einer Zentrierhilfe bei 1100 rpm, 3 min, 4°C (Hettich Rotixa/RP, Rotor #2250) auf einen Histobond-Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) zentrifugiert. Zur Entfernung überstehender Flüssigkeit wurde die Zentrierhilfe entfernt und für 1 min bei 1100 rpm, 4°C zentrifugiert. Nach Lufttrocknung und Lagerung bei -80°C können die Präparate für Immunohistochemie eingesetzt werden.

2.6 Nukleinsäuren-Analyse

2.6.1 Gewebe-Homogenisierung

Zur Zerkleinerung und späteren RNA-Extraktion wurden humane Hautproben auf einer trockeneisgekühlten Stahlplatte in einem Stück mit RNaseZap (Ambion, Huntingdon, UK) behandelten Aluminium-Folie mit Flüssigstickstoff übergossen. Die hart gefrorene Probe wurde mit einem Hammer und Flachmeißel grob vorzerkleinert, im Anschluss zusammen mit einer Stahlkugel in ein geeignetes Teflongefäß gegeben, 1 min in Flüssigstickstoff tiefgefroren und 1 min bei 2000

rpm im Mikrodismembrator, Model U (B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) zerkleinert. Die Zerkleinerung mit Tiefkühlen wurde dreimal, oder bis zur vollständigen Pulverisierung der Probe, wiederholt. Die zerkleinerten Proben wurden anschließend in 5 ml TRIZOL aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.6.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA wurde mit TRIZOL (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987) durchgeführt. Dazu wurden Zellen nach Entfernen des Kulturüberstandes oder homogenisiertes Gewebe in ein bzw. 5 ml TRIZOL aufgenommen. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform wurden die Proben 20 min bei 10000 rpm, 4°C (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit Sorvall SA-600 Rotor) zentrifugiert. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein sauberes Gefäß übernommen, die Interphase mit genomischer DNA und die proteinhaltige, rötliche Phenolphase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit einem Volumen auf -20°C vorgekühltes Isopropanol versetzt und durch mehrfaches Invertieren vermischt. Bei Proben mit wenig Ausgangsmaterial wurde 1 µl Glykogen (Roche, Basel, Schweiz) zugegeben, um ein besser sichtbares Pellet zu erhalten. Die RNA wurde ÜN bei -20°C gefällt und 30 min bei 10000 rpm, 4°C pelletiert. Die Lage des Pellets im Röhrchen wurde markiert, der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen.

2.6.3 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham Biosciences, Freiburg,

Deutschland). Die Absorption bei 280 nm gibt den Proteingehalt der Lösung, die Absorption bei 320 nm dagegen die Streuung an. Durch Erstellen des Quotienten A_{260}/A_{280} erhält man die Reinheit der Nukleinsäureproben; dieser liegt für saubere Aufarbeitungen bei $\geq 1,8$. Der Messwert der Absorption bei 320 nm wird von den Messwerten bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.* (Sambrook, 1989) berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A_{260} von 1 genau 50 µg DNA/ml, für RNA 40 µg RNA/ml.

2.6.4 Reverse-Transcription-PCR

Zur reversen Transkription von Gesamt-RNA zu cDNA wurden 4 µg RNA in 10 µl DEPC-H₂O (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 1 µl DNase I (Roche, Mannheim, Deutschland), 1,5 µl 5x RT-Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 1 µl RNase-Inhibitor (RNasin, Roche, Mannheim, Deutschland) und 2,5 µl DEPC-H₂O für 20 min bei 37°C und 10 min bei 70°C im Thermocycler (Biometra TRIO-Thermoblock mit TRIO Heated Lid, Biometra, Göttingen, Deutschland) behandelt. Nach Zugabe von 3,6 µl Oligo dT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 0,4 µl Random Hexamer (Promega, Mannheim, Deutschland) folgten 10 min bei 70°C im Thermocycler, das Annealing erfolgte auf Eis. Nach Zugabe von 4,5 µl 5x-Puffer, 1,5 µl dNTP (Invitrogen), 1 µl DTT (Invitrogen) und 1 µl RNasin erfolgte eine Inkubation im Thermocycler für 2 min bei 42°C. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 2 µl Superscript II (Invitrogen) für 50 min, 42°C und 10 min, 70°C im Thermocycler. Abschließend wurde eine Konzentration von 10 ng/µl RNA eingestellt, basierend auf der RNA-Konzentrationsmessung vor der RT-PCR.

2.6.5 Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR wurde wie zuvor beschrieben mit einem AbiPrism7000 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt (Homey *et al.*, 2000; Muller

et al., 2001). In Anwesenheit von 12,5 µl TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems), 0,625 µl genspezifischer TaqMan® Probe, 0,5 µl genspezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 0,5 µl DEPC-H₂O wurden 25 ng cDNA amplifiziert. Zur internen Positivkontrolle wurden je 0,125 µl 18S RNA-spezifische Sonde und Primer eingesetzt (Applied Biosystems). Als genspezifische Sonden wurden FAM-markierte Oligonukleotide eingesetzt. Alternativ wurden 25 ng cDNA mit genspezifischen Primerpaaren und SYBR-green Mastermix amplifiziert, wobei 2,5 µl eines 2µM Primermix und 12,5 µl SYBR-green Mastermix zusammen mit 25 ng cDNA in 10 µl H₂O verwendet wurden. Folgende Reaktionstemperaturen wurden gewählt: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 10 Minuten und 40 Wiederholungen 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Die Expression des Zielgens wurde nach der Expression der 18S RNA normalisiert, um die einzelnen Proben vergleichen zu können. Chemokinspezifische Primer wurden von Applied Biosystems kommerziell erworben oder als proprietäre Sequenzen von DNAX, Palo Alto, USA zur Verfügung gestellt. Die Plasmide zur Quantifizierung der Chemokinexpression wurden freundlicherweise von Albert Zlotnik, DNAX, Palo Alto, USA zur Verfügung gestellt.

2.7 Datenanalyse

2.7.1 Statistik

Für die Statistik wurde entweder ein mit Microsoft Excel 2000/2003 ausgeführter Student's t-Test nach vorherigem Test auf Gleichverteilung (F-Test) genutzt. Für die Analyse der Expressionsdaten in den Erkrankungen der Haut wurde der nichtparametrische Wilcoxon Zwei-Proben-Test genutzt. Da hier keine Funktion in der zur Verfügung stehenden Software existierte, wurde dabei ein Dienst auf der Internetseite der Universität von Amsterdam, Institute for Phonetic Sciences genutzt (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html).

2.7.2 Shrunken-Centroid Analyse

Zur besseren Visualisierung der Daten aus der quantitativen real-time PCR wurde die „shrunken-centroid“ Analyse verwendet, wie sie von Tibshirani et al. vorgestellt wurde (Tibshirani *et al.*, 2002). Dazu wurde die unter GPL verfügbare Software PAM for Excel und das ebenfalls unter GPL verfügbare R-Statistikpaket verwendet.

2.7.3 Diagramme

Alle Diagramme wurden in Microsoft Excel 2000/2003 oder, falls Achsenumbrüche erforderlich waren, in Microcal Origin V7 generiert und anschließend in CorelDraw 11 beschriftet und formatiert.

3 Ergebnisse

3.1 Entzündliche Erkrankungen der Haut – ein molekularbiologischer Vergleich

Um Atopie-assoziierte Mitglieder der Chemokinsuperfamilie zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein systematischer Vergleich der mRNA-Expression von Chemokinen in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen der Haut als Ausgangspunkt gewählt. Dazu wurde eine Fülle von cDNA aus einzelnen Hautproben zusammengestellt, mit deren Hilfe sich Mitglieder der Chemokinsuperfamilie identifizieren lassen, die in entzündlichen Erkrankungen der Haut im Vergleich mit gesunder Haut auf mRNA-Ebene spezifisch hochreguliert werden. Dazu wurde mRNA aus Hautproben von gesunden Individuen (n=14), läsionalen Hautbereichen von Patienten mit atopischer Dermatitis (n=12), Lupus erythematodes (n=9) und Psoriasis (n=36) sowie nichtläsionalen Hautbereichen von Psoriasis-Patienten (n=12) gewonnen und zu cDNA transkribiert. Diese wurde mit Hilfe der quantitativen real-time PCR untersucht. Um einen einfachen Überblick über relevante Chemokine in den untersuchten Erkrankungen zu erreichen, und um bei der Darstellung der Expressionsprofile aller bekannten humanen Chemokine unüberschaubare Fülle aus Einzeldaten zu präsentieren, wurde eine Darstellung mit „shrunk centroids“ nach Tibshirani et al. (Tibshirani *et al.*, 2002) gewählt. Kurz zusammengefasst errechnet diese Methode einen Schwerpunkt für alle Klassen, der gebildet wird, indem die durchschnittliche Genexpression in jeder Klasse durch die klasseninterne Standardabweichung dividiert wird. Die einzelne Probe wird dabei der Klasse zugeordnet, zu deren Schwerpunkt sie den geringsten Abstand aufweist. In der „shrunk“-Modifikation wird zusätzlich ein Schrumpfungsfaktor gewählt, mit dem nur unwesentlich exprimierte Gene unterdrückt werden. In die Analyse werden logarithmierte Expressionsdaten aus quantitativen real-time Analysen eingesetzt, so dass sich eine einheitenlose Darstellung ergibt. Die Abbildung wurde mit Hilfe von PAM (Prediction Analysis for Microarrays) for Excel, einer Schnittstelle für das R-

Statistikpaket (beide unter GPL verfügbar), bei einem gewählten Schwellenwert von 0,5 generiert und mit CorelDraw coloriert (Abbildung 7). Im Rahmen dieser Analyse lassen sich sechs Chemokine als spezifisch in der atopischen Dermatitis hochreguliert identifizieren: CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL26 und CCL27.

Von den so identifizierten Chemokinen sind CCL1, CCL18 und CCL26 bisher in der Literatur wenig untersucht worden. Daher konzentriert sich die vorliegende Arbeit besonders auf diese Chemokine, mit einem Schwerpunkt auf CCL1.

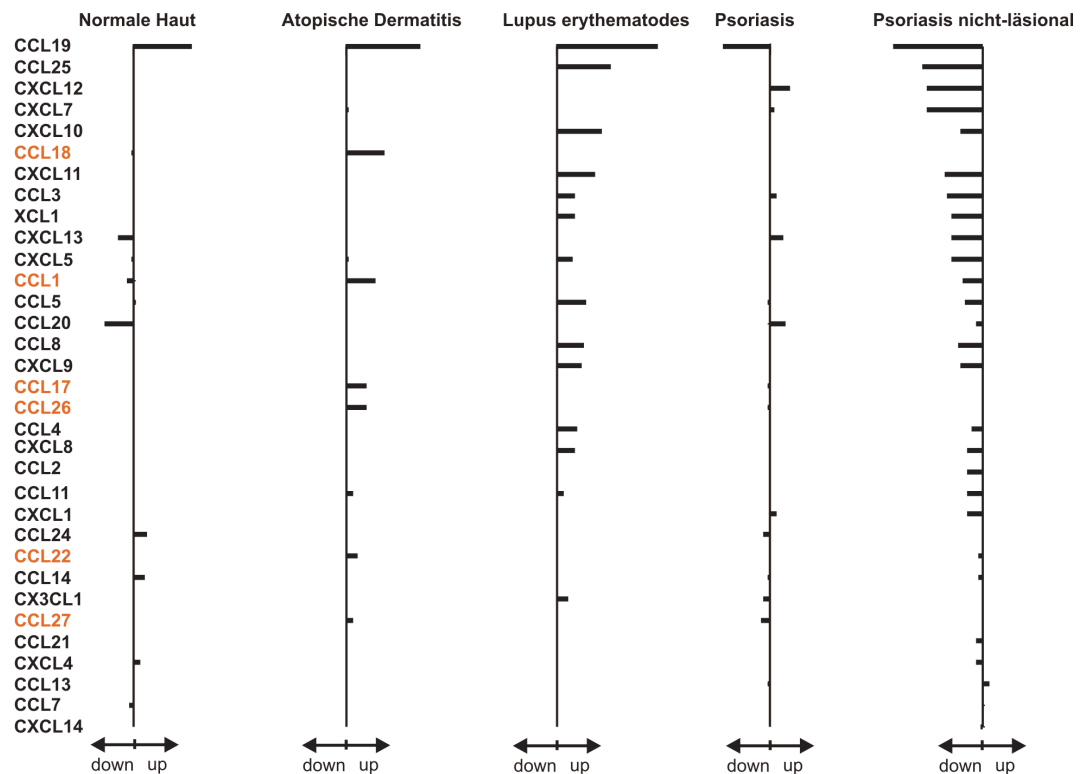


Abbildung 7: CCL1, 17, 18, 22, 26 und 27 werden in atopischer Dermatitis spezifisch reguliert. „Shrunken centroid“-Darstellung der Expressionsprofile der Chemokinsuperfamilie in normaler Haut, atopischer Dermatitis, Lupus erythematodes und Psoriasis. Horizontale Einheiten bezeichnen die logarithmierten Verhältnisse der Genexpression. Vereinfacht gesagt zeigt die Abbildung die Abweichung der Expression einer Klasse (Erkrankung oder normaler Haut) vom Schwerpunkt aller Klassen – und damit deren Hoch- oder Herunterregulation.

3.2 CCL1

3.2.1 CCL1 ist ein inflammatorisches Chemokin, das spezifisch mit Entzündungen in atopischer Haut assoziiert ist.

Wie bereits oben beschrieben, wurde cDNA aus Haut von gesunden Donoren (n=14), nichtläsionalen Psoriatikern (n=12), läsionalen Psoriatikern (n=36), nichtläsionalen Atopikern (n=3), läsionalen Atopikern (n=12) und läsionalen Lupus erythematodes-Patienten (n=9) systematisch mittels quantitativer real-time PCR und spezifischen Primern und Sonden auf ihre Chemokinexpression hin untersucht. So konnte gezeigt werden, dass CCL1 (Abbildung 7, Abbildung 8 A) und CCL17 mRNAs (Abbildung 7, Abbildung 8 B) selektiv und signifikant in atopischer Dermatitis herauf reguliert werden. Im Gegensatz dazu zeigt CCL20 (Abbildung 7, Abbildung 8 C) eine signifikante Induktion in Psoriasis (Wilcoxon Zwei-Proben-Test, *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$)

Um einen Einblick in die anatomische Lokalisation und den zellulären Ursprung von CCL1 und seinem spezifischen Rezeptor, CCR8, zu erhalten, wurden immunohistochemische Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen CCL1 (Abbildung 9 A-C) und CCR8 (Abbildung 9 D-F), sowie passender Isotypkontrollen, die keine Färbung aufwiesen (Daten nicht gezeigt), durchgeführt. CCL1 konnte in normaler Haut (Abbildung 9 A) oder nichtläsionaler Haut (Daten nicht gezeigt) von Patienten mit atopischer Dermatitis nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte CCL1 in großen Mengen in der basalen Ebene der Epidermis in der läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (Abbildung 9 B) nachgewiesen werden. Weiterhin wiesen dermale Endothelzellen (Abbildung 9 C) Immunoreaktivität für CCL1 auf. Neben den Endothelzellen fand sich CCL1 in Zellen, welche eine dendritische Morphologie aufweisen (Abbildung 9 B, C).

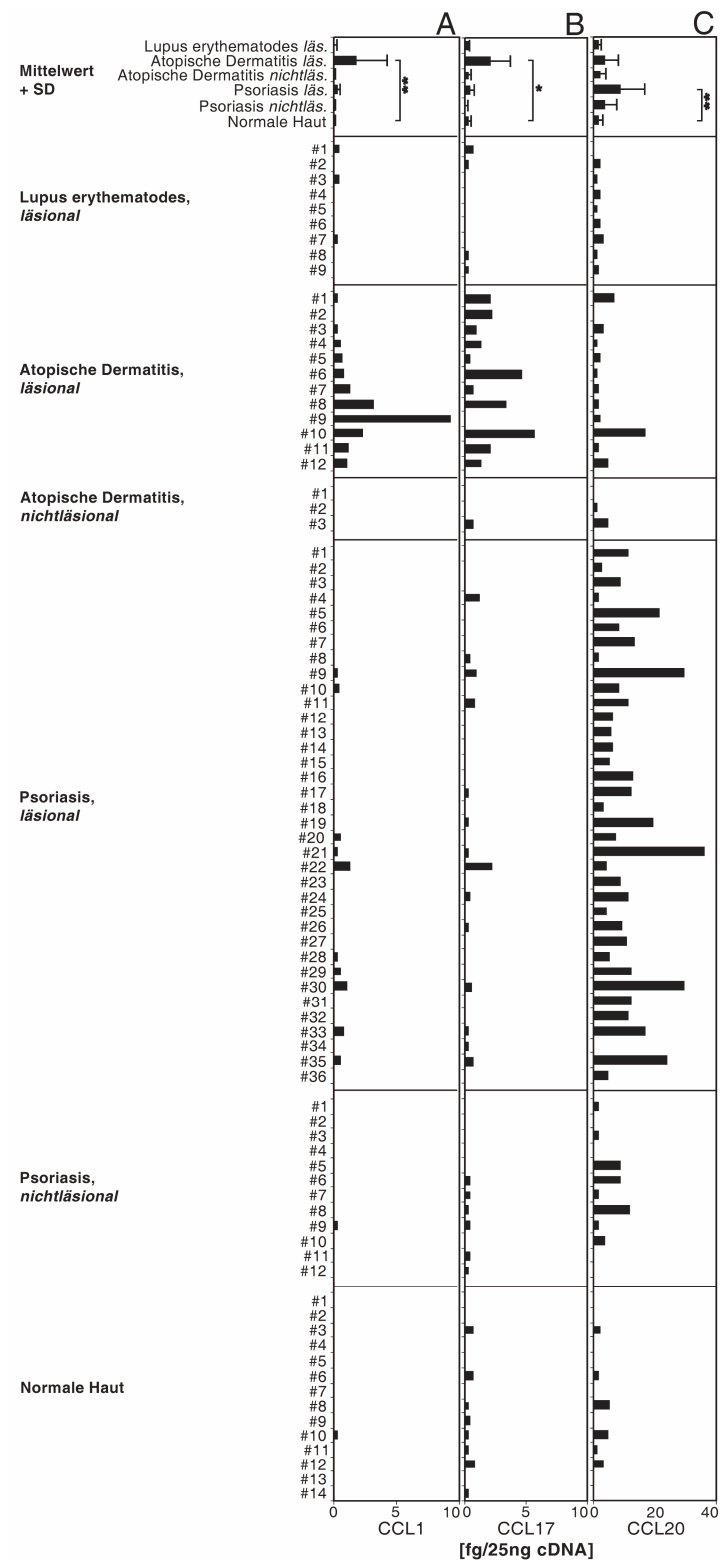


Abbildung 8: CCL1 und CCL17 werden selektiv in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis herauf reguliert. Quantitative real-time PCR Analyse von CCL1- (A), CCL17- (B) und CCL20- (C) Expression in lässionaler (n=12) und nichtlässionaler Haut (n=3) von Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich mit lässionaler (n=36) und nichtlässionaler (n=12) Haut von

Psoriasis-Patienten, läsionaler Haut von Lupus erythematoses Patienten (n=9) und normaler Haut (n=14). Die Werte sind in Femtogramm Zielgen cDNA in 25 ng cDNA angegeben, es werden Einzelwerte sowie Mittelwerte der einzelnen Gruppen und deren Standardabweichungen gezeigt. Ein Wilcoxon Zwei-Proben-Test wurde durchgeführt: *, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

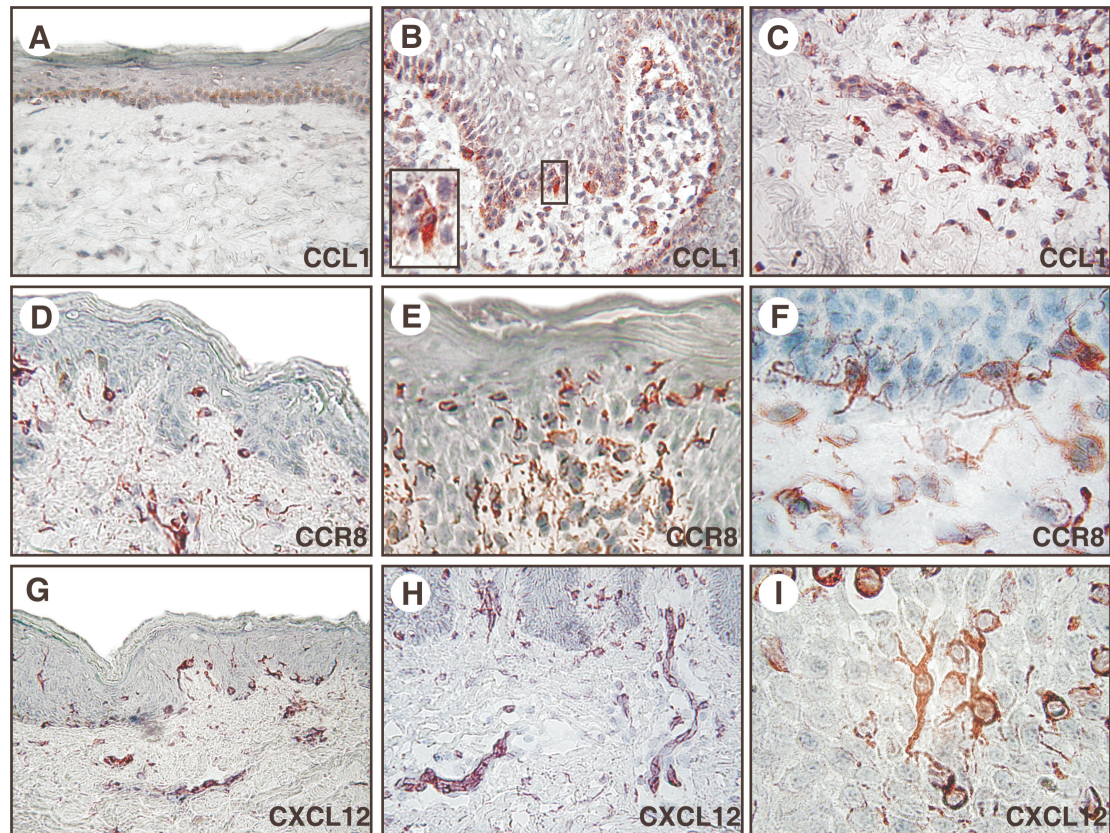


Abbildung 9: Induktion von CCL1 in der Epidermis und dermalen Kompartimenten der läsionalen Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis. Immunohistochemische Analysen zeigen, dass CCL1 in normaler Haut nicht vorkommt (A), jedoch in läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (B und C), wo sich eine Färbung in der basalen Schicht der Epidermis (B), in Zellen mit dendritischer Morphologie (B, Kasten) und auf endothelialen Zellen des superfiziellen dermalen Plexus (C) zeigen lässt. Verglichen mit normaler Haut (D) weist läsionale atopische Haut eine deutliche Zunahme an CCR8-positiven, hautinfiltrierenden Zellen auf (E, F). Innerhalb der CCR8-positiven, hautinfiltrierenden Zellen weist eine große Subpopulation eine dendritische Morphologie auf (E). Im Gegensatz zu CCL1 wird das homöostatische Chemokin CXCL12 von endothelialen Zellen und von Populationen dermalen dendritischer Zellen sowohl in gesunder Haut (G) sowie läsionaler atopischer Haut (H) exprimiert. (I) zeigt CXCL12-exprimierende dendritische Zellen in der Epidermis läsionaler atopischer Haut. Repräsentative Abbildungen von $n \geq 3$, originale Vergrößerungen: A-E, G, H x400, F, I, x1000.

In normaler Haut zeigte sich sowohl bei Endothelzellen als auch bei Zellen mit dendritischer Morphologie eine Immunreaktivität für CCR8, den spezifischen Rezeptor für CCL1 (Abbildung 9 D). In läsionaler Haut von Patienten mit

atopischer Dermatitis fand sich eine dramatische Zunahme an CCR8-positiven Zellen in der Epidermis (Abbildung 9 E, F). Bei höheren Vergrößerungen ließ sich eine CCR8-positive Subpopulation von Zellen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis erkennen, die eine dendritische Morphologie besitzt.

Zusammen betrachtet identifizieren diese Beobachtungen CCL1 als ein inflammatorisches und atopie-assoziiertes Chemokin, das in epidermalen und dermalen Kompartimenten der Haut produziert wird und dessen spezifischer Rezeptor, CCR8, sich auf hautinfiltrierenden Zellen mit dendritischer Morphologie findet.

3.2.2 Inflammatorische Zytokine und mikrobielle Produkte regulieren die Expression von CCL1

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche zellulären Bestandteile der Haut an der Regulation von CCL1 beteiligt sind. Vorangehende immunohistologische Untersuchungen legten nahe, dass dendritische Zellen und Endothelzellen die Hauptquellen für CCL1 in läsionaler atopischer Haut sein könnten. Da bekannt ist, dass primäre proinflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, T_H -Effektorzytokine wie IL-4 und $\text{IFN-}\gamma$ sowie mikrobielle Produkte eine tragende Funktion in der Initiation und Amplifikation atopischer Hautentzündungen besitzen (Zollner *et al.*, 2000; Leung, 2003; Leung *et al.*, 2004), wurde deren Rolle bei der CCL1-Regulation untersucht. Quantitative real-time PCR zeigte, dass CCL1 mRNA konstitutiv in ruhenden dermalen Endothelzellen exprimiert wurde und eine deutliche Induktion nach $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$ -Aktivierung erreicht werden konnte (Abbildung 10 A). Kultivierte epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten exprimierten CCL1 weder in ruhendem noch stimulierten Zustand in signifikantem Maße. Betrachtet man interstitielle dendritische Zellen und Langerhans-artige Zellen, so zeigt sich, dass Langerhans-artige Zellen, im Gegensatz zu interstitiellen dendritischen Zellen und ihren monozytären Vorläufern, CCL1 *in vitro* konstitutiv exprimieren.

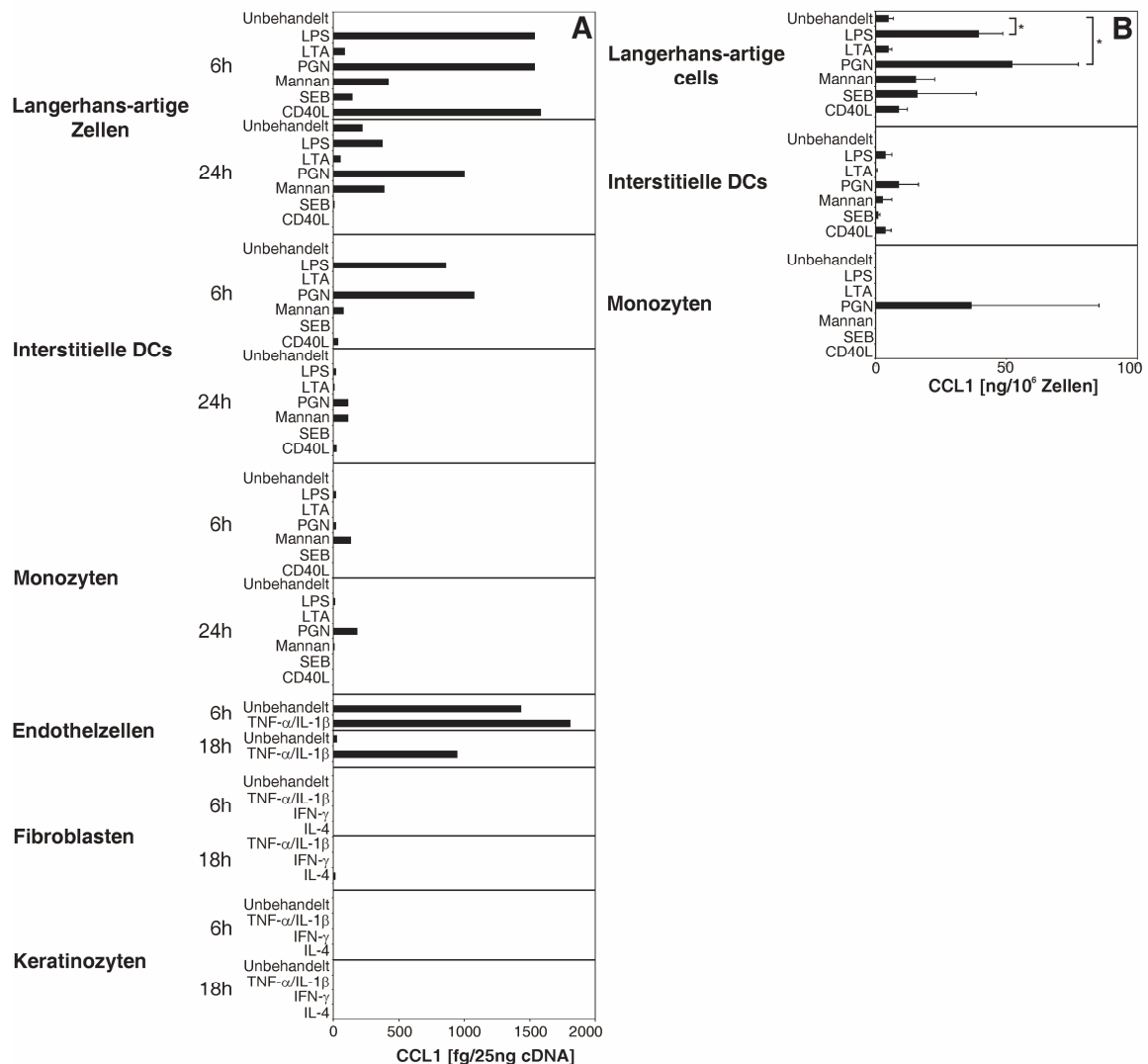


Abbildung 10: Langerhans-artige Zellen und Endothelzellen sind die Hauptquellen von CCL1 unter den zellulären Bestandteilen der Haut. (A) Quantitative real-time PCR-Analyse der CCL1-Expression in cDNA aus kultivierten strukturellen Zellen der Haut. Monozyten, Langerhans-artige und interstitielle dendritische Zellen wurden in Gegenwart und Abwesenheit von LPS, LTA, PGN, Mannan, SEB oder CD40L für 6 und 25 Stunden kultiviert. Humane primäre dermale Endothelzellen, dermale Fibroblasten und Keratinozyten wurden entweder mit TNF- α /IL1 β , IFN- γ und IL-4 stimuliert oder für 6 und 24 Stunden unstimuliert belassen. Die Werte sind in Femtogramm Zielgen cDNA in 25 ng cDNA angegeben. (B) Sekretion von CCL1 durch Langerhans-artige und dendritische Zellen und ihre monozytären Vorläufer. Die Zellen wurden mit LPS, LTA, PGN, Mannan, SEB und CD40L behandelt oder mit Medium für 24 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf ihre CCL1-Expression untersucht. Die Werte sind in Nanogramm Protein pro 10⁶ Zellen angegeben. Ein Student's t-Test wurde durchgeführt; *, p<0,05

3.2.3 Bindung und Kreuzvernetzung von IgE induziert CCL1 in Mastzellen

IgE-vermittelte Aktivierung von Mastzellen und dendritischen Zellen kennzeichnet die atopische Hautentzündung (Leung *et al.*, 2003). Immunohistochemische Analysen von dermalen Einzelzellsuspensionen identifizieren humane dermale Mastzellen als Quelle von CCL1. Humane dermale Mastzellen aus Einzelzellsuspensionen der Haut zeigen große Mengen an CCL1 in ihrem Zytoplasma (Abbildung 11 B). Zusätzlich konnte die kooperierende Arbeitsgruppe von Harri Alenius in der Dermatologie der Universitätsklinik Helsinki im Mausmodell zeigen, dass aus Knochenmark differenzierte Mastzellen nach 8 Stunden Kreuzvernetzung mit DNP-spezifischem IgE und spezifischem Antigen eine dramatische, etwa 40.000fache Steigerung in ihrer CCL1 mRNA-Expression zeigen (Abbildung 11 C).

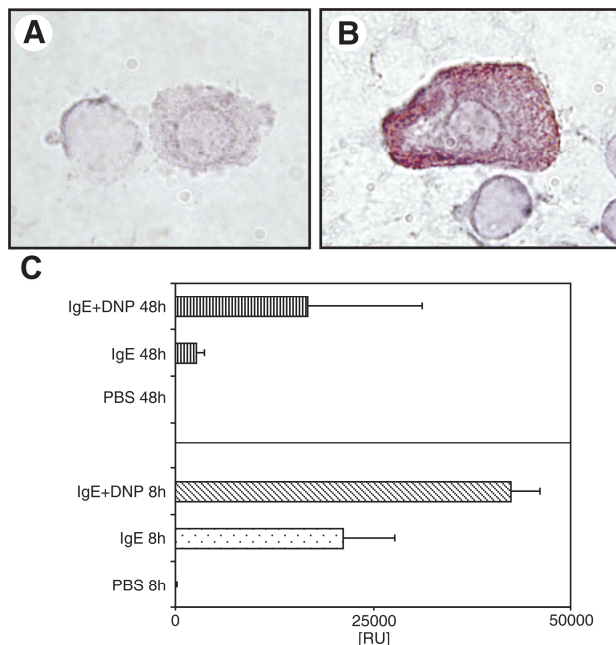


Abbildung 11: Allergen-spezifische IgE-Kreuzvernetzung von IgE induziert CCL1 in Mastzellen. Immunohistochemie enthüllt eine ausgeprägte CCL1 Protein-Expression in humanen Mastzellen (B) im Vergleich mit der Isotypkontrolle (A). Vergrößerungen: x1000. (C) Quantitative real-time PCR-Analyse der CCL1/TCA-3-Expression mit PBS, DNP-spezifischem IgE oder DNP-spezifischem IgE und DNP-behandelten, aus Knochenmark differenzierten Mastzellen der Maus.

3.2.4 Allergenkontakt induziert die Produktion von CCL1 in Patienten mit atopischer Dermatitis.

Um die Relevanz von CCL1 in der Pathogenese der atopischen Dermatitis zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Antti Lauerma an der Dermatologie der Universitätsklinik von Helsinki ein Atopie-Patch-Test durchgeführt. Dabei wurden vor und nach 2, 6 und 48 Stunden nach Antigenkontakt 6 mm-Biopsien entnommen. Mit Hilfe der in Helsinki gewonnenen Biopsien konnten mittels Immunohistochemie sowohl atopieähnliche Veränderungen in der Haut sichtbar gemacht werden (perivaskuläres Infiltrat, elongierte Papillen), als auch ein Anstieg der CCL1-Expression nach 48 Stunden Antigenexposition gezeigt werden (Abbildung 12 A-C). Mittels quantitativer real-time PCR konnte bei 8 von 9 Patienten ein deutlicher Anstieg der CCL1 mRNA-Produktion 6 bis 48 Stunden nach Antigenexposition gezeigt werden (Abbildung 12 D). Im Anschluss wurden Seren von gesunden Donoren (n=11) mit dem von Atopikern in der nichtläsionalen Phase (n=2) und der läsionalen Phase (n=32) der Erkrankung mittels ELISA auf ihren CCL1-Gehalt hin untersucht (Abbildung 12 E). Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass die Serumspiegel an CCL1 in Seren von Patienten in der läsionalen Phase der atopischen Dermatitis um einen Faktor 3 höher lag als die Serumspiegel an CCL1 von gesunden Donoren oder Patienten in der nichtläsionalen Phase (Student's t-Test wurde durchgeführt; *, $p<0,05$).

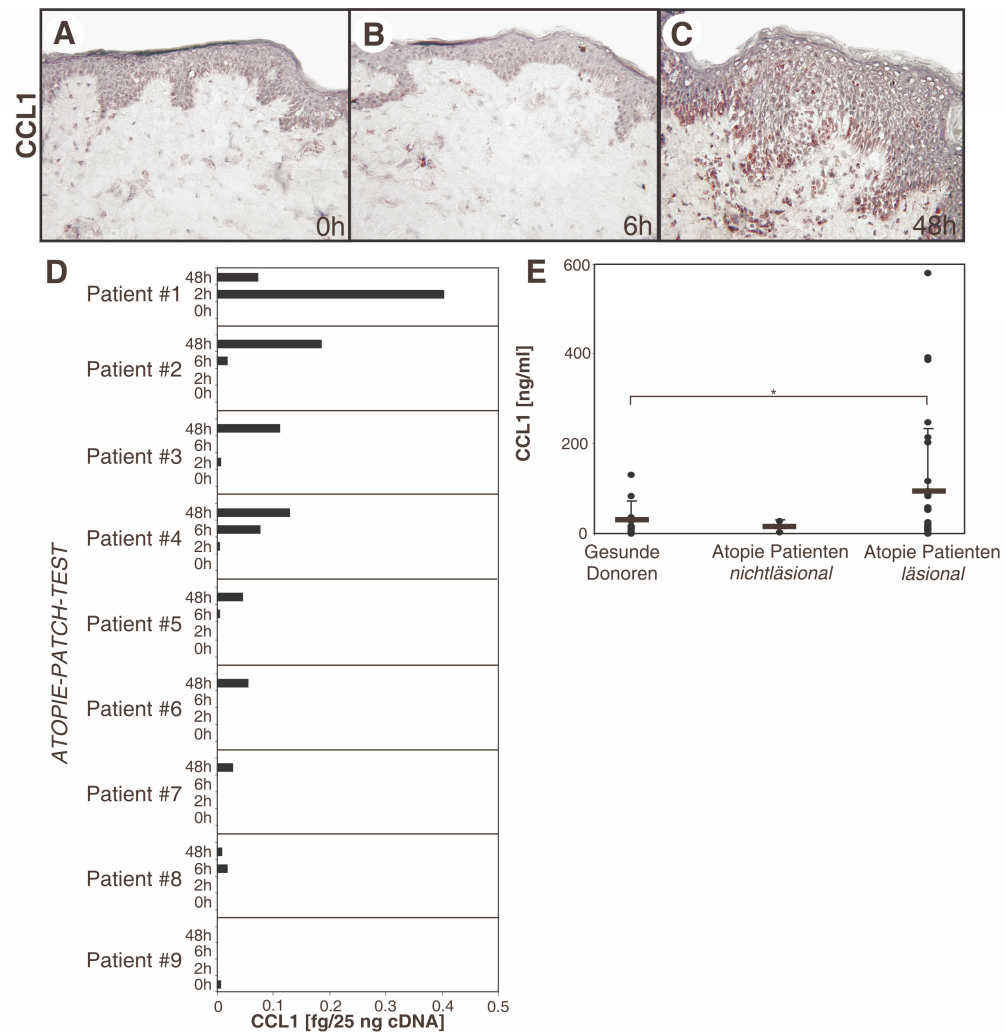


Abbildung 12: Allergenkontakt induziert CCL1 Expression in vivo. (A-C) Detektion von CCL1 mittels Immunohistochemie in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis nach topischer Exposition mit Hausstaubmilben-Allergen (Atopie-Patch-Test). Vernachlässigbare CCL1-Mengen vor (A) und nach (B) 6 Stunden Antigenexposition. Eine deutliche Zunahme in der CCL1-Expression kann nach 48 Stunden beobachtet werden (C). Vergrößerungen A-C: 250x. (D) Quantitative real-time PCR-Analyse mit Biopsien der Teilnehmer des Atopie-Patch-Tests (n=9). Hautproben wurden vor und nach 2, 6 und 48 Stunden nach topischer Antigenexposition entnommen. Werte sind in Femtogramm des Zielgens pro 25 Nanogramm cDNA angegeben. (E) Ein CCL1-spezifischer ELISA wurde mit Serumproben von gesunden Donoren (n=11), Patienten mit atopischer Dermatitis in der läsionalen (n=32) oder nichtläsionalen (n=2) Phase der Erkrankung durchgeführt. Patienten mit läsionaler atopischer Dermatitis zeigen verglichen mit gesunden Donoren und nichtläsionalen Patienten mit atopischer Dermatitis erhöhte CCL1-Serumspiegel. Werte sind in ng Protein pro ml Serum angegeben. Einzelmessungen und Mittelwert + Standardabweichung werden gezeigt. Ein Student's t-Test wurde durchgeführt: *, p<0.05.

3.2.5 T-Zell-Subpopulationen, Monozyten und Subpopulationen dendritischer Zellen exprimieren CCR8.

Um einen Überblick über die biologische Relevanz von CCL1 zu bekommen, wurde die Verteilung von CCR8 auf T-Zellen in peripherem Blut untersucht (Abbildung 14 D, E). Parallel wurde im INSERM U 255, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Clinique in Paris unter Leitung von Marie-Caroline Dieu-Nosjean die Verteilung von CCR8 auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Langerhans-artigen Zellen durchgeführt (Abbildung 14 A-C). So konnte gezeigt werden, dass sich CCR8 auf der Zelloberfläche einer kleinen Subpopulation zirkulierender $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen befindet und seine Expression nicht mit der Expression des kutanen Leukozyten-Antigens (CLA) korreliert (Abbildung 14 D). Dabei war der Anteil von $CCR8^+$ in der $CD4^+$ -und in der $CD8^+$ -Subpopulation etwa gleich groß. In intrazellulären Färbungen zeigte sich, dass die Mehrheit der T-Zellen (>90%) CCR8 in ihrem Zytoplasma lagert (Daten nicht gezeigt). Weitergehende Analysen zeigten, dass CCR8 nach einer kurzen Aktivierung (2 Stunden) der Lymphozyten mit ConA an die Zelloberfläche umgelagert wird (Abbildung 14 E). Im Gegensatz zur Stimulation mit ConA führte eine Stimulation mit PHA oder anti-CD3/anti-CD28 nicht zu einer Externalisierung des Rezeptors.

Diese Beobachtungen zeigen, dass CCR8 auf Leukozyten-Subpopulationen exprimiert wird, die eine zentrale Rolle in der atopischen Hautentzündung spielen. Desweiteren demonstrieren sie einen neuen Regulationsweg für einen Chemokinrezeptor, was auf eine schnelle lokale Modulation der Ansprechbarkeit hin deutet.

3.2.6 Die Expression von CCR8 wird während der frühen Differenzierung dendritischer Zellen und bei Aktivierung beibehalten

Um einen Einblick in den Signalweg der Rekrutierung dendritischer Zellen während der Initiation und Amplifikation der atopischen Dermatitis zu bekommen, wurden durch unseren Kooperationspartner am INSERM U 255 Studien zur Modulation der Expression von CCR8 während der Differenzierung von

dendritischen Zellen aus Monozyten aus peripherem Blut und deren Reifung in Anwesenheit von atopie-assoziierten bakteriellen Produkten und T-Zell- Signalen durchgeführt (Abbildung 14). Zur Differenzierung wurden Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 sechs Tage kultiviert, anschließend mit GM-CSF und mit oder ohne IL-4 kultiviert, um ihren unreifen Phänotyp zu erhalten. Unter beiden Konditionen wurden die Zellen die letzten beiden Tage unbehandelt belassen oder mit CD40L behandelt. CCR8 konnte auf frisch isolierten Monozyten nachgewiesen werden (Tag 0). Während der Differenzierung ging die CCR8-Expression bis zum Ende der Kultivierung kontinuierlich zurück. Nach Entzug von IL-4 während der Tage 6 - 8 erholte sich die CCR8-Expression auf der Oberfläche, verglichen mit Zellen, die kontinuierlich mit IL-4 kultiviert wurden, von 40% auf 70% (Abbildung 14 C). Nachfolgend zeigte sich ein fortschreitender Verlust an CCR8 in den letzten Tagen der Differenzierung der dendritischen Zellen in Anwesenheit von GM-CSF (Abbildung 14 C). Im Gegensatz zu anderen Chemokinrezeptoren, die bekannterweise auf dendritischen Zellen vorkommen (wie CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 und CCR7) veränderte sich die Expression von CCR8 nicht nach einer Aktivierung mit CD40L. Daher wurde der Einfluss Atopie-assoziiierter mikrobieller Produkte auf die CCR8-Expression auf dendritischen Zellen untersucht. Die Zellen wurden für zwei Tage mit LPS, LTA, PGN, Mannan, SEB und CD40L kultiviert oder unbehandelt belassen. Die CCR8-Expression konnte durch keines dieser mikrobiellen Produkte beeinflusst werden. Abhängig vom einzelnen Experiment zeigte sich eine leichte Herunterregulation von CCR8 durch LPS (Abbildung 13).

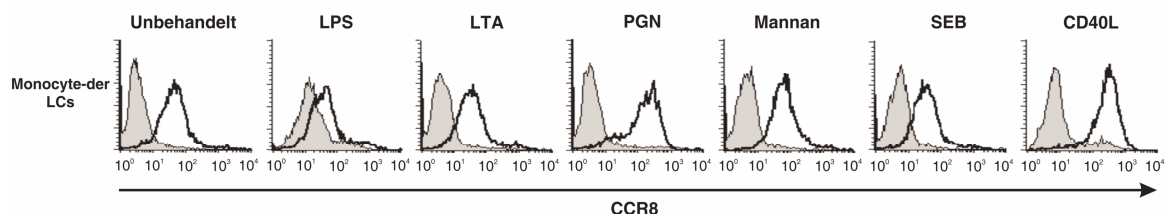


Abbildung 13: Die CCR8-Expression Langerhans-artiger Zellen wird nicht durch mikrobielle Produkte moduliert. Monozyten wurden durch Kultivierung mit GM-CSF, IL-4 und TGF- β zu Langerhans-artigen Zellen differenziert und entweder 48 Stunden mit LPS, LTA, PGN, Mannan, SEB oder CD40L stimuliert oder unbehandelt belassen. Die CCR8-Expression wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Grau unterlegte Histogramme zeigen die Isotypkontrollen. Repräsentative Daten von n=3 Donoren.

Diese Beobachtungen zeigen, dass CCR8 während der Differenzierung dendritischer Zellen durch das T_H2-Zytokin IL-4 reversibel herunterreguliert wird. Desweiteren haben atopie-assoziierte mikrobielle Produkte oder T-Zell-Signale keinen Einfluss auf die CCR8-Expression.

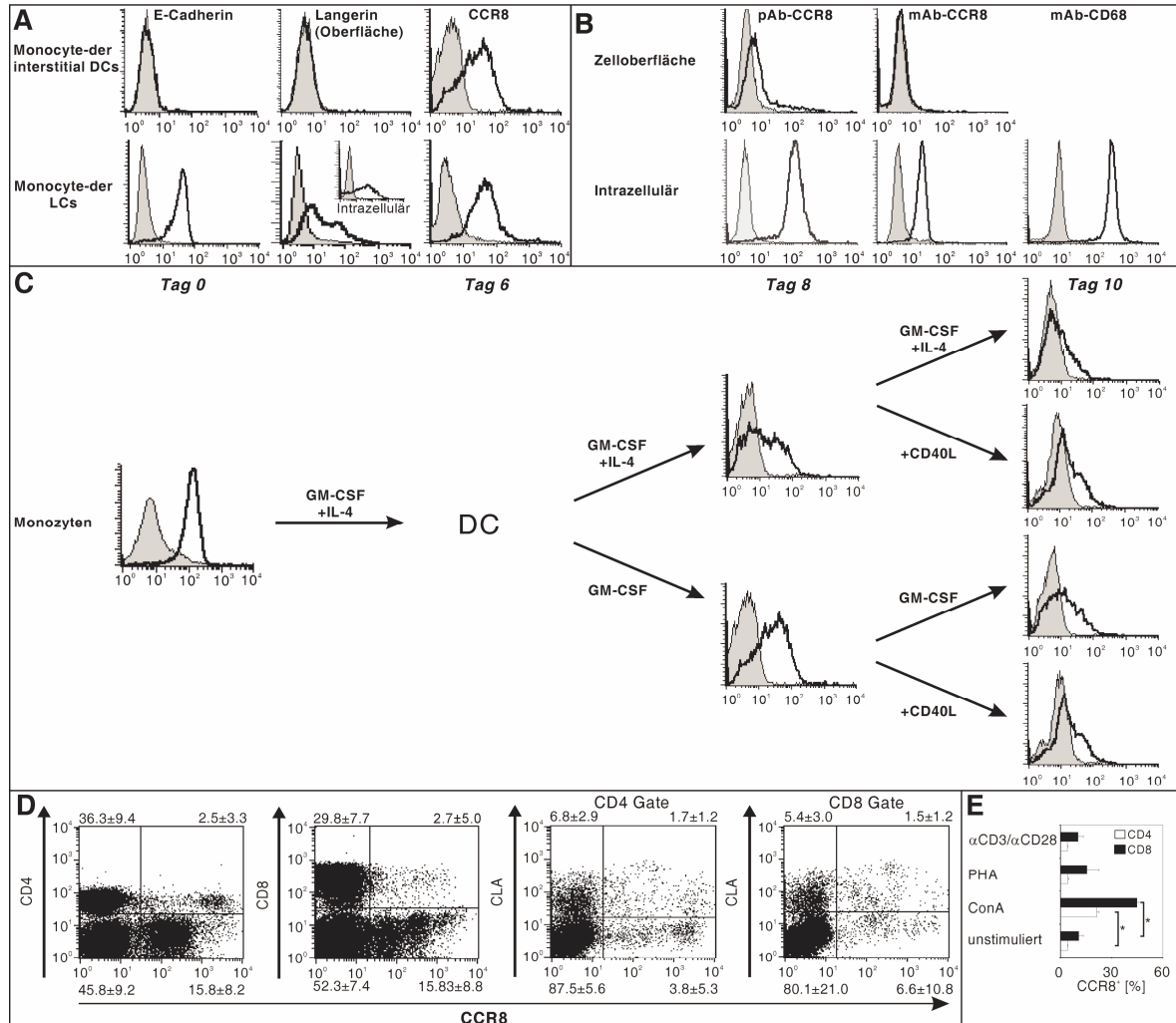


Abbildung 14: CCR8 wird auf dendritischen Zellen, ihren Vorläufern und einer T-Zell-Subpopulation exprimiert. Die CCR8-Expression wurde mittels analytischer Durchflußzytometrie auf Monozyten, interstitiellen dendritischen Zellen, Langerhans-artigen Zellen und T-Zellen aus peripherem Blut bestimmt. (A) Oberflächenexpression von CCR8 auf E-Cadherin⁺, Langerin/CD207⁺ interstitiellen und E-Cadherin⁺, Langerin/CD207⁺ Langerhans-artigen Zellen. (B) CCR8 Zelloberflächen- und Intrazelluläre Färbung auf/in Langerhans-artigen Zellen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen humanes CCR8. Zellpermeabilisierung wurde durch CD68-Färbung überprüft. (C) Regulation der CCR8-Expression während der Differenzierung (C)

dendritischer Zellen. Monozyten wurden in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 innerhalb von 6 Tagen in dendritische Zellen differenziert. Nachfolgend wurden die dendritischen Zellen mit GM-CSF oder GM-CSF und IL-4 bis zum Tag 10 weiterkultiviert. Während der letzten beiden Tage wurden sie entweder unbehandelt belassen, oder mit den T-Zell-Signal CD40L aktiviert. Grau unterlegte Histogramme zeigen die Isotypkontrolle, Daten repräsentativ für $n > 3$ Donoren (D, E). CCR8-Expression auf ruhenden und aktivierten T-Zellen aus dem peripheren Blut. PBMCs wurden mit mABS gegen CD4, CD8, CLA und CCR8 gefärbt. (E) CCR8-Expression auf $CD4^+$ -(weiss) und $CD8^+$ -(schwarz) Zellen nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28, PHA, ConA im Vergleich mit unstimulierten Zellen. Ein Student's t-Test wurde durchgeführt; *, $p < 0,05$

3.2.7 Das inflammatorische Chemokin CCL1 zeigt zusammen mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12 synergetische Effekte bei der Rekrutierung von $CCR8^+$ T-Zellen und dendritischen Zellen.

Als weiterer Schritt wurde die biologische Aktivität von CCR8 auf Leukozytenpopulationen untersucht. Überraschenderweise war CCL1 bei verschiedensten Konzentrationen allein nicht in der Lage, eine Migration bei CCR8-exprimierenden Leukozyten-Subpopulationen zu induzieren (Abbildung 15). Da Vanbervliet et al. (Vanbervliet *et al.*, 2003) ähnliche Beobachtungen mit CXCR3-Liganden bei plasmazytoiden dendritischen Zellen gemacht hatten und dort eine synergistische Kooperation zwischen CXCR3 Liganden und CXCL12 beobachten konnten, wurde zunächst die anatomische Verteilung von CXCL12 in der atopischen Dermatitis untersucht. Mittels Immunohistochemie konnte CXCL12 in Endothelzellen und in Zellen mit dendritischer Morphologie sowohl in gesunder Haut (Abbildung 15 G) als auch in läsionaler atopischer Haut (Abbildung 15 H, I) gefunden werden. Im Gegensatz zu normaler Haut, in der CCL1 nicht nachgewiesen werden konnte, überlappt die anatomische Lokalisation von CCL1 und CXCL12 in der atopischen Dermatitis (Abbildung 9). Tatsächlich lockte CCL1 zusammen mit suboptimalen Dosen CXCL12 synergetisch $CD4^+$ (Abbildung 15 A), $CD4^+CLA^+$ (Abbildung 15 B) und $CD8^+$ (Abbildung 15 C), $CD8^+CLA^+$ (Abbildung 15 D) in dosisabhängiger Art und Weise an. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml CCL1 und 10 ng/ml CXCL12 konnte ein signifikanter Anstieg der Migration in allen untersuchten T-Zell-Subpopulationen gezeigt werden, mit einer maximalen Migration in der $CD8^+CLA^+$ -Subpopulation (Abbildung 15 D). Insgesamt migrierten zwischen 8 und 16% der Startpopulationen auf den CCL1/CXCL12-Gradienten. In

Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte im INSERM U255 in Paris gezeigt werden, dass sich mit dem Cocktail aus CCL1 und CXCL12 ebenfalls das Migrationsverhalten von dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen synergetisch beeinflussen ließ (Abbildung 15 E, F). Bei Monozyten (Abbildung 15 G) konnte dieser Synergismus jedoch nicht beobachtet werden.

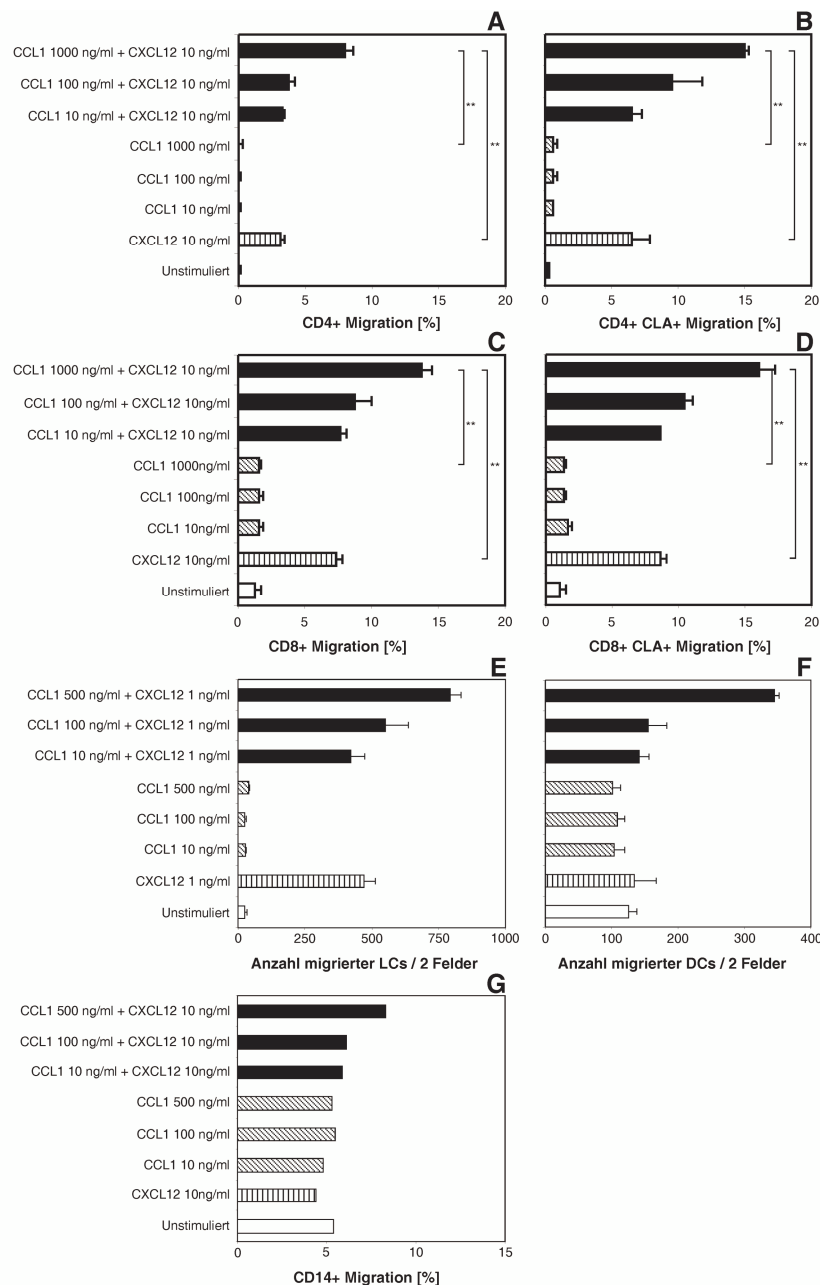


Abbildung 15: CCL1 und das homöostatische Chemokin CXCL12 zeigen synergistische Effekte bei der Rekrutierung von Leukozytensubpopulationen. Periphere, mononukleäre Zellen (A-D) und Monozyten (G) von gesunden Donoren wurden in Transwell-Chemotaxis-Assays auf ihre Fähigkeit, auf CCL1 (10, 100, 1000 ng/ml), CXCL12 (10 ng/ml, suboptimale Konzentration) oder die Kombination aus CCL1 und CXCL12 hin zu migrieren untersucht. Der Prozentsatz der migrierten CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD4⁺CLA⁺ (C) CD8⁺CLA⁺ (D) T-Zellen sowie CD14⁺ Monozyten (G) wurde durch den Vergleich mit einer Startpopulation von 10⁶ Zellen in Dreifachansätzen bestimmt. Langerhans-artige und interstitielle dendritische Zellen wurden in einem Boyden-Kammer-Versuch auf ihre Fähigkeit der Migration zu CCL1 (10, 100, 1000 ng/ml), CXCL12 (1 oder 10 ng/ml, suboptimale Konzentration) und die Kombination aus CCL1 und CXCL12 hin untersucht. Werte sind als Anzahl der migrierten dendritischen Zellen pro zwei mikroskopischer Felder (x20 Vergrößerung) angegeben. Daten sind repräsentativ für n≥4 verschiedene Donoren. Ein Student's t-Test wurde durchgeführt; *, p<0,05, **, p<0,01.

3.3 CCL18

3.3.1 Erhöhte Expression von CCL18 in der Haut ist mit dem Phänotyp der atopischen Dermatitis assoziiert.

Während der bereits oben für CCL1 beschriebenen quantitativen real-time PCR-Analyse zur Identifikation atopie-assoziiierter Mitglieder der Chemokinfamilie zeigte sich CCL18/DC-CK1 (Abbildung 16, Abbildung 7) als signifikant ($p < 0,001$) in der Haut von Patienten mit läsionaler atopischer Dermatitis reguliertes Chemokin. Vergleicht man die absolute Menge an mRNA in läsionaler atopischer Haut, so war es mehr als 100fach höher exprimiert als CCL17 (Abbildung 16 B). Gleichzeitig stellt CCL18 das am höchsten regulierte atopiespezifische Chemokin der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chemokine dar.

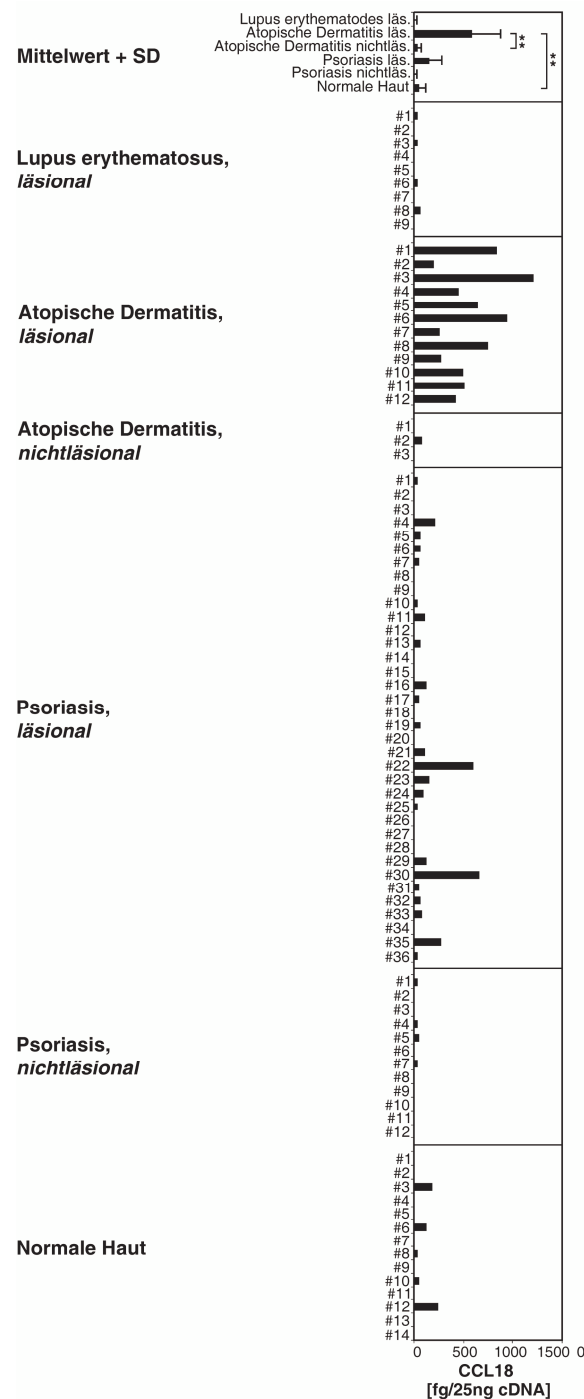


Abbildung 16: Die CCL18-Expression ist spezifisch mit dem Phänotyp der atopischen Dermatitis assoziiert. Quantitative real-time PCR-Analyse der CCL18-Expression in läsionaler (n=12) und nichtläsionaler Haut (n=3) von Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich mit läsionaler (n=36) und nichtläsionaler (n=12) Haut von Psoriasis-Patienten, läsionaler Haut von Lupus erythematosus-Patienten (n=9) und normaler Haut (n=14). Die Werte sind in Femtogramm Zielgen cDNA in 25 ng cDNA angegeben, es werden Einzelwerte sowie Mittelwerte der einzelnen Gruppen und deren Standardabweichungen gezeigt. Ein Wilcoxon Zwei-Proben-Test wurde durchgeführt: **, $p < 0,01$.

3.3.2 Mikrobielle Produkte von *Staphylococcus aureus* induzieren CCL18-Produktion *in vitro*.

Da primäre proinflammatorische Zytokine (TNF- α und IL-1 β), T_H Zell-vermittelte Effektorzytokine (IL-4 und IFN- γ) sowie mikrobielle Produkte für die Initiation und Amplifikation der atopischen Hautentzündung bedeutsame Rollen haben (Zollner *et al.*, 2000; Leung, 2003; Leung *et al.*, 2004), wurde ihr Einfluss auf die Regulation von CCL18 untersucht. *In vitro* konnte eine Stimulation humaner Keratinozyten und dermalen Fibroblasten mit IFN- γ eine erhöhte CCL18-Expression induzieren. Neben IFN- γ konnte auch eine Stimulation mit dem Typ 2 Zytokin IL-4 die Expression von CCL18-Transkripten (Abbildung 17 A) in dermalen Fibroblasten erhöhen. Im Gegensatz zu den strukturellen Zellen der Haut exprimierten ruhende Langerhans-Zellen und besonders interstitielle dendritische Zellen CCL18-spezifische Transkripte in signifikant höherer Menge (>100fach) (Abbildung 17 B, C). Um den Einblick in die Regulation von CCL18 zu vertiefen, wurde eine quantitative real-time PCR-Analyse mit Monozyten sowie Langerhans-artigen Zellen und interstitiellen dendritischen Zellen monozytärer Herkunft, die mit mikrobiellen Produkten aus Pilzen (Mannan), Gram-negativer (LPS) und Gram-positiver (PGN, SEB, LTA) Bakterien, oder einem T-Zell-Aktivierungssignal (CD40L) behandelt wurden (Abbildung 17 B, C), durchgeführt. LPS, PGN, Mannan und CD40L induzierten dabei eine deutliche Expression an CCL18 mRNA in Monozyten, was durch unsere Kooperationspartner im INSERM U255 in Paris mittels ELISA auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Abbildung 17 D). Im Gegensatz zu Monozyten exprimierten Langerhans-artige und interstitielle dendritische Zellen CCL18 konstitutiv. Weiterhin resultiert die Stimulation Langerhans-artiger dendritischer Zellen mit PGN in einer schnellen Regulation von CCL18-Transkripten *in vitro*. (Abbildung 17 B, C). Im ELISA (Abbildung 17 D) konnte durch unseren Kooperationspartner zudem nachgewiesen werden, dass beide Subpopulationen dendritischer Zellen CCL18 in hohem Umfang bilden; die Proteinmenge lag zwischen 0,92 bis 2,62 bzw. 14,25 und 23,19 ng/10⁶ Zellen.

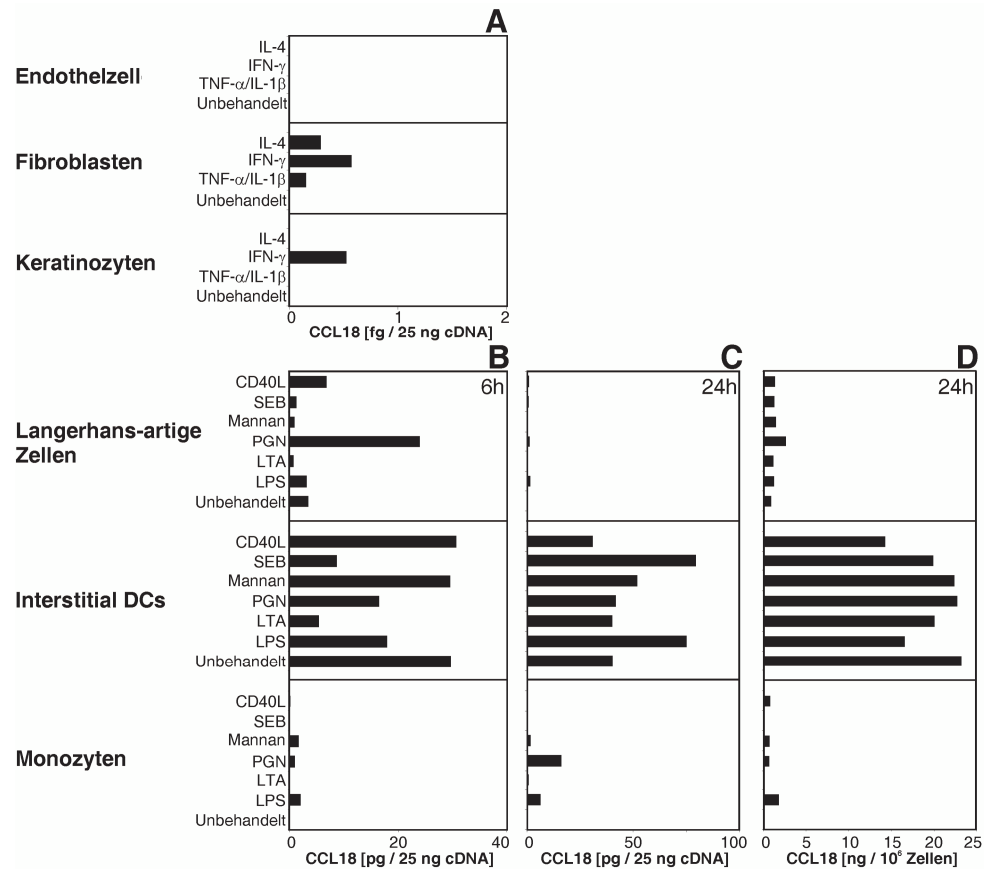


Abbildung 17: T-Zell-Effektorzytokine und Produkte von *S. aureus* regulieren CCL18.

Quantitative real-time PCR- und ELISA-Analysen der CCL18-Expression in zellulären Hautbestandteilen. (A) Analyse der CCL18 cDNA aus Kulturen humaner Keratinocyten, dermalen Fibroblasten und dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, die mit Medium allein, TNF α /IL-1 β , IFN- γ oder IL-4 für 18 Stunden stimuliert wurden. Werte sind in Femtogramm Zielgen pro 25 ng cDNA angegeben. (B, C) Analyse der CCL18 mRNA in Monozyten, Langerhans-artigen und interstitiellen dendritischen Zellen nach 6 Stunden und 24 Stunden, nach Stimulation mit Medium allein, LPS, LTA, PGN, Mannan und CD40L. Werte sind in Picogramm Zielgen pro 25 Nanogramm cDNA angegeben. (D) ELISA Analyse der CCL18 Expression in Monozyten, Langerhans-artigen und interstitiellen dendritischen Zellen nach 6 Stunden und 24 Stunden nach Stimulation mit Medium, LPS, LTA, PGN, Mannan und CD40L. Werte sind in ng Protein pro 10⁶ Zellen angegeben.

3.3.3 Allergen- und Superantigenexposition induzieren CCL18-Expression *in vivo*.

Topische Exposition nichtläsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis mit relevanten Allergenen induziert Hautläsionen, die einer atopischen Dermatitis ähnlich sind, was für eine entscheidende Rolle von Allergenen als Auslöser der

atopischen Dermatitis spricht (Leung *et al.*, 2003). Um einen besseren Einblick in die Pathogenese der atopischen Dermatitis zu erhalten, wurde aus 8 Patienten mit einer atopischer Dermatitis und positiver Prick-Testung auf Hausstaubmilben-Allergen vor und nach 2, 6 und 48 Stunden topischer Exposition mit Hausstaubmilben-Antigen eine Hautprobe entnommen und mittels quantitativer real-time PCR oder Immunohistochemie untersucht. CCL18-Transkripte wurden 48 Stunden nach topischer Exposition mit *D. pteronyssimus* und *D. farinae* signifikant hochreguliert ($p < 0,05$, Abbildung 18 A). Betrachtet man die individuelle Kinetik der Chemokinexpression der einzelnen Patienten, so wird die CCL18 mRNA bereits 2-6 Stunden nach Allergenkontakt induziert (Abbildung 18 A). Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR konnten in durch immunohistochemische Analysen bestätigt werden (Pivarcsi *et al.*, 2004). Läsionen aus Atopie-Patch-Tests zeigen 48 Stunden nach Allergenexposition deutlich erhöhte Mengen an CCL18-positiven Zellen. In der selben Studie gelang es zudem, *in vitro* eine 25-fache Erhöhung der CCL18 mRNA-Produktion nach Stimulation mit rekombinantem Hausstaubmilben-Allergen (*Der p 2*) zu zeigen. Da die Besiedlung mit superantigenproduzierenden Bakterien wie *S. aureus* atopische Dermatitis auslösen kann (Zollner *et al.*, 2000; Laouini *et al.*, 2003), wurde die CCL18-Expression in 6 Patienten vor und nach 2, 6 und 48 Stunden nach SEB-Exposition untersucht. Topische SEB-Exposition induzierte auf mRNA-Ebene eine signifikante Zunahme (Student's t-Test wurde durchgeführt; *, $p < 0,05$) der CCL18-Expression, wie mittels quantitativer real-time PCR gezeigt werden konnte (Abbildung 18 B). Darüber hinaus konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Superantigenstimulation (SEB) von PBMCs eine schnelle und deutliche Erhöhung der CCL18-Expression *in vitro* bewirkt (Pivarcsi *et al.*, 2004), was darauf hin deutet, dass hautinfiltrierende Leukozyten die Hauptquelle für eine durch Superantigene ausgelöste CCL18-Produktion darstellen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass relevante Allergene und Superantigene eine CCL18-Produktion zu induzieren vermögen.

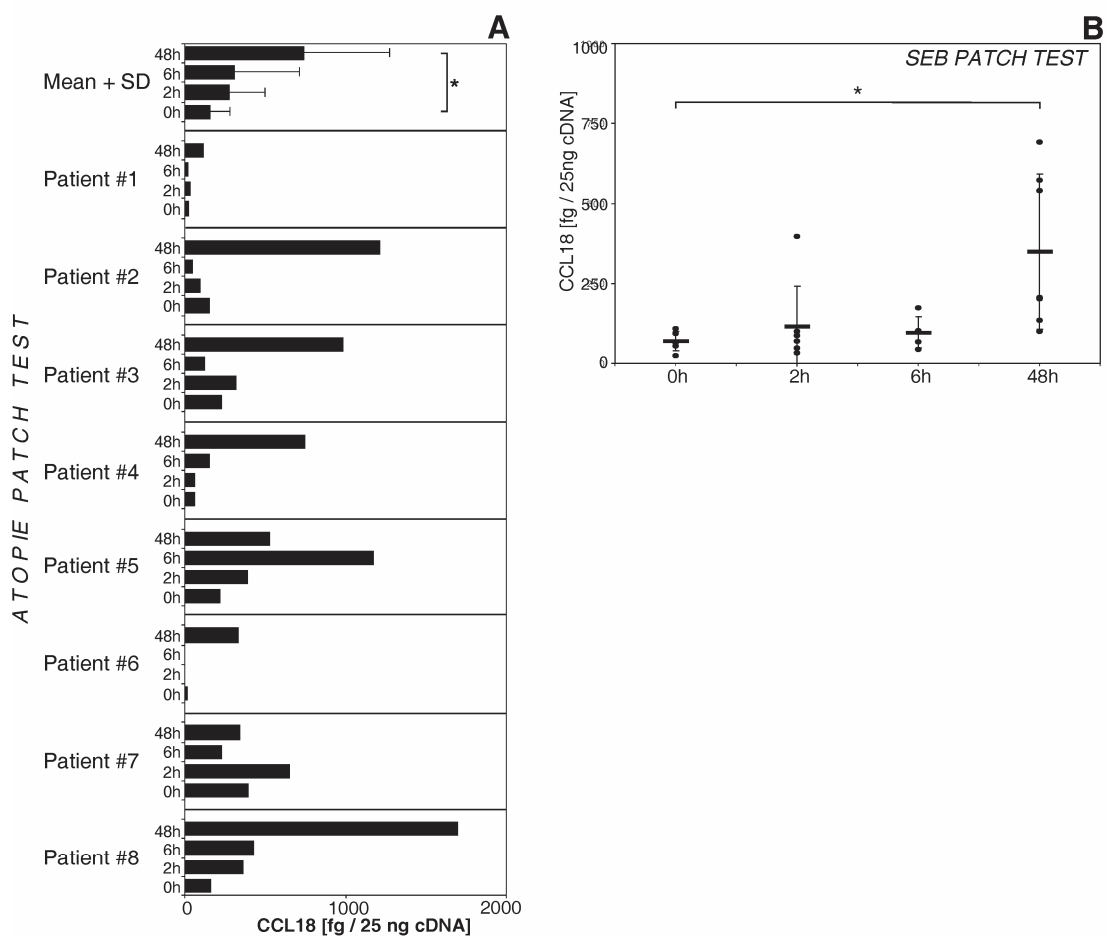


Abbildung 18: Allergen und Superantigenexposition induzieren CCL18-Expression in vivo. Quantitative real-time PCR-Analyse der CCL18 Expression in Patienten mit atopischer Dermatitis nach Atopie-Patch-Test. Die Hautproben wurden vor und nach 2, 6 und 48 Stunden Antigenexposition entnommen. (B), quantitative real-time PCR-Analyse der CCL18-Expression in Patienten mit atopischer Dermatitis nach SEB-Patch-Test. Die Hautproben wurden 0, 2, 6 und 48 Stunden nach SEB-Exposition entnommen. Werte sind in Femtogramm Zielgen pro 25 Nanogramm cDNA angegeben. Ein Student's t-Test wurde durchgeführt; *, $p < 0,05$.

3.4 CCL26

3.4.1 CCL26 stellt ein Atopie-assoziiertes Mitglied der Eotaxin-Familie dar

Während des unter 3.1 beschriebenen Vergleichs der Chemokinexpression in atopischer Dermatitis, Psoriasis und Lupus erythematodes rückte auch CCL26 als Atopie-assoziiertes Chemokin in den Blickwinkel des Interesses. CCL26/*Eotaxin-3* bildet zusammen mit CCL11/*Eotaxin* und CCL24/*Eotaxin-2* die Eotaxin-Familie. Die Mitglieder der Eotaxin-Familie binden spezifisch an CCR3 (Zlotnik *et al.*, 2000) und rekrutieren Eosinophile (Shinkai *et al.*, 1999; Menzies-Gow *et al.*, 2002; Dent *et al.*, 2004), die im inflammatorischen Infiltrat in einer atopischen Hautläsion anzutreffen sind (Rho *et al.*, 2004). Aus diesem Anlass wurde die Eotaxin-Familie, bestehend aus CCL11 (Abbildung 19 A), CCL24 (Abbildung 19 B) und CCL26 (Abbildung 19 C) auf ihre Expression mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Hierfür wurden cDNA Proben aus gesunder Haut (n=14), nichtläsionaler Psoriasis (n=12), läsionaler Psoriasis (n=36), nichtläsionaler atopischer Dermatitis (n=3), läsionaler atopischer Dermatitis (n=12) und läsionalem Lupus erythematodes (n=9) verwendet. Im Rahmen der Expressionsanalyse stellte sich heraus, dass innerhalb der Eotaxin-Familie das signifikant hochregulierte CCL26 (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) in der atopischen Dermatitis das am stärksten regulierte Chemokin innerhalb der Eotaxin-Familie darstellte.

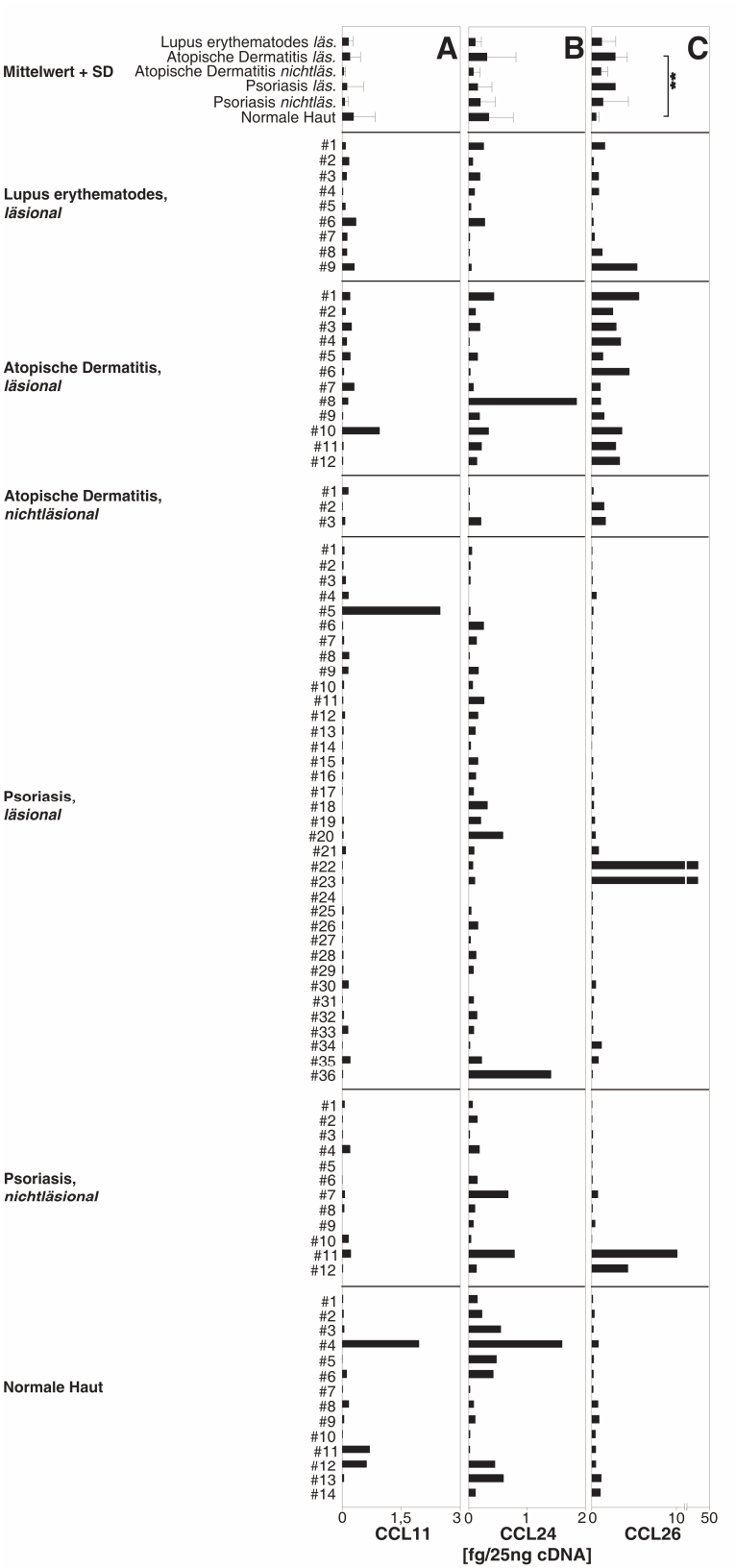


Abbildung 19: CCL26 ist selektiv in läsionaler atopischer Dermatitis hochreguliert. Quantitative real-time PCR-Analyse der CCL11- (A), CCL24- (B) und CCL26-Expression (C) in nichtläsionaler (n=3) und läsionaler (n=12) atopischer Dermatitis verglichen mit läsionaler (n=36) und nichtläsionaler (n=12) Haut von Patienten mit Psoriasis, läsionaler Haut von Patienten mit läsionalem Lupus erythematodes (n=9) und Haut von gesunden Donoren (n=14). Die Werte sind in Femtogramm des Zielgens pro 25 Nanogramm cDNA angegeben. Einzelwerte und Mittelwerte + Standardabweichung werden gezeigt. Ein Wilcoxon-Test wurde durchgeführt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Um einen Einblick in die anatomische Lokalisation und den zellulären Ursprung von Mitgliedern der Eotaxin-Familie und ihres Rezeptors, CCR3, in der Haut zu erhalten, wurden Hautbiopsien aus normaler Haut und läsionaler atopischer Haut immunohistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen CCL11 (Abbildung 20 A-C), CCL24 (Abbildung 20 D-F), CCL26 (Abbildung 20 G-L) und CCR3 (Abbildung 20 M-O) untersucht.

Während CCL11 (Abbildung 20 B, C) nur in geringem Umfang exprimiert wird, konnte CCL 24 (Abbildung 20 E, F) in normaler und läsionaler atopischer Haut nicht nachgewiesen werden. CCL26 war nicht in normaler Haut nachzuweisen (Abbildung 20 H), kommt jedoch in großen Mengen in den oberen Keratinozytenschichten der Epidermis und auf dermalen Endothelzellen innerhalb der läsionalen atopischen Haut vor (Abbildung 20 I). In normaler Haut zeigten nur wenige Leukozyten Immunoreaktivität für CCR3, den Rezeptor der Eotaxin-Familie (Abbildung 20 N), während läsionale atopische Haut einen deutlichen Zuwachs an CCR3⁺-Zellen im inflammatorischen Infiltrat innerhalb dermalen und epidermalen Kompartimente aufweist. Zusätzlich findet sich CCR3 auf den Keratinozyten der basalen Schichten der Epidermis (Abbildung 20 O).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass CCL26 in der atopischen Dermatitis das am stärksten regulierte Mitglied der Eotaxin-Familie darstellt. CCL26 wird innerhalb dermalen und epidermalen Kompartimente der Haut produziert.

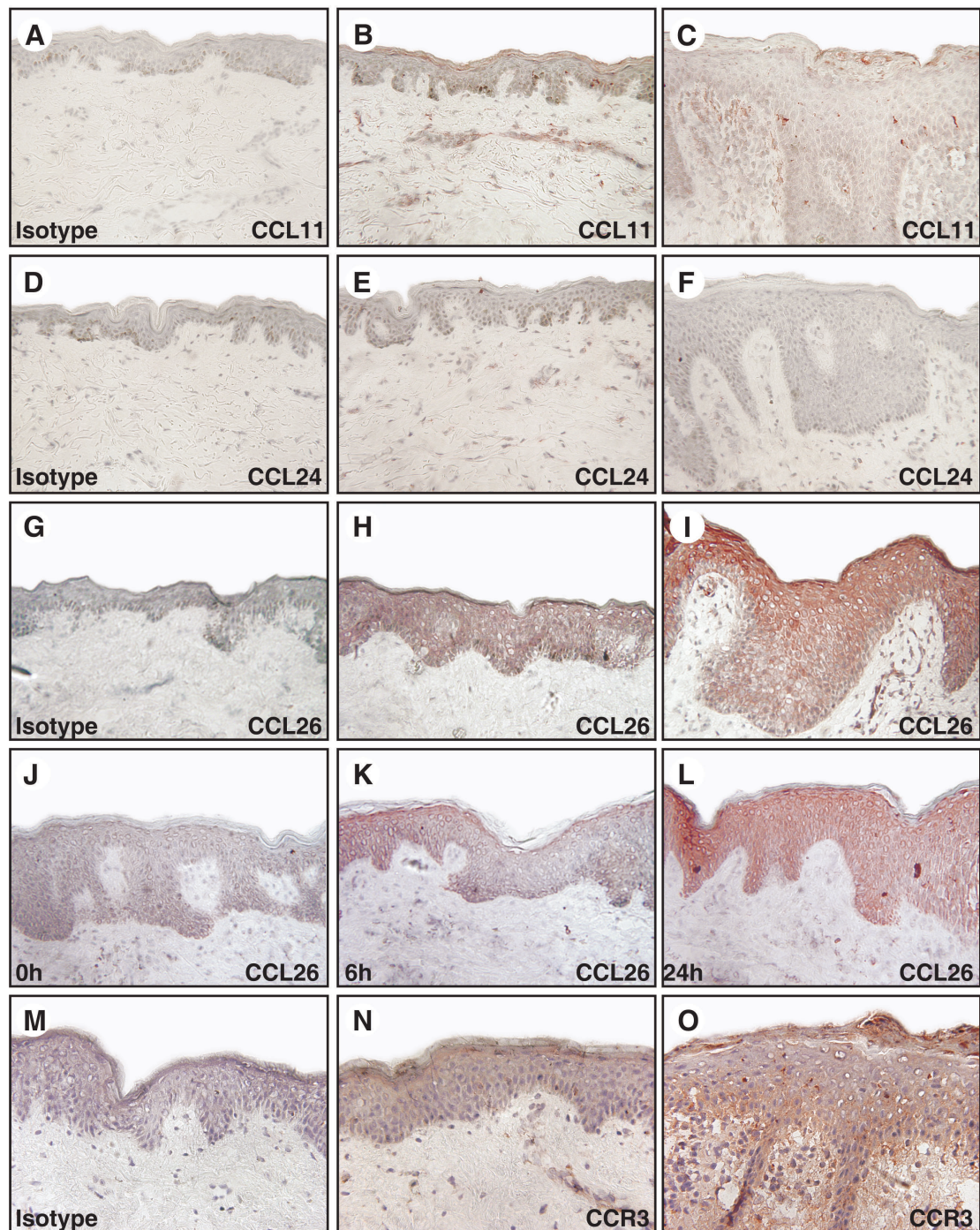


Abbildung 20: Induktion von Mitgliedern der Eotaxin-Familie in epidermalen und dermalen Kompartimenten läsionaler atopischer Haut. Immunohistochemische Analysen zeigen, dass CCL11 in normaler und läsionaler Atopischer Haut gering exprimiert wurde (B) und CCL24-Protein in normaler Haut (E) und läsionaler atopischer Haut (C, F) nicht exprimiert wird. CCL26 kann ebenfalls in normaler Haut nicht nachgewiesen werden (H), wird jedoch in großem Umfang in der läsionalen atopischen Haut vorgefunden (I), wo eine deutliche Färbung in der suprabasalen Schicht der Epidermis und in endothelialen Zellen des superfiziellen Plexus beobachtet werden kann. Vor (J) und 6 Stunden nach SEB-Exposition (K) findet sich nur eine vernachlässigbare Expression von CCL26 in der Haut von Atopie-Patienten, die jedoch nach 24 Stunden deutlich ausgeprägt ist (L). Der Rezeptor der Eotaxin-Familie, CCR3, kann in normaler Haut nicht

nachgewiesen werden (N), ist jedoch in läsionaler atopischer Haut in den basalen Schichten der Epidermis und auf Zellen des inflammatorischen Infiltrates deutlich angefärbt.

In einem nächsten Schritt wurde die Regulation von Mitgliedern der Eotaxin-Familie in zellulären Bestandteilen der Haut untersucht. Vorhergehende immunohistochemische Untersuchungen legten nahe, dass Keratinozyten wichtige Produktionsstätten für CC26 in der atopischen Haut darstellen. Da bekannt ist, dass T_H-Zytokine (z. B. IL-4 und IFN- γ) eine Schlüsselrolle in der Initiation und Amplifikation der atopischen Dermatitis innehaben (Leung *et al.*, 2003), wurde deren Einfluss auf die Regulation der Mitglieder der Eotaxin-Familie untersucht. Die Analyse von dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten zeigte, dass die Expression von CCL11 in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, Fibroblasten, Melanozyten (A) und CCL26 (C) in Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten durch das T_H2-Zytokin IL-4 reguliert wird. CCL24 konnte nur in Spuren in Endothelzellen und Fibroblasten nach Aktivierung mit IL-10, IFN- γ und den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α /IL-1 β nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Produktion von CCL26 an Zytokine, die von T_H2-Zellen produziert werden, gekoppelt ist.

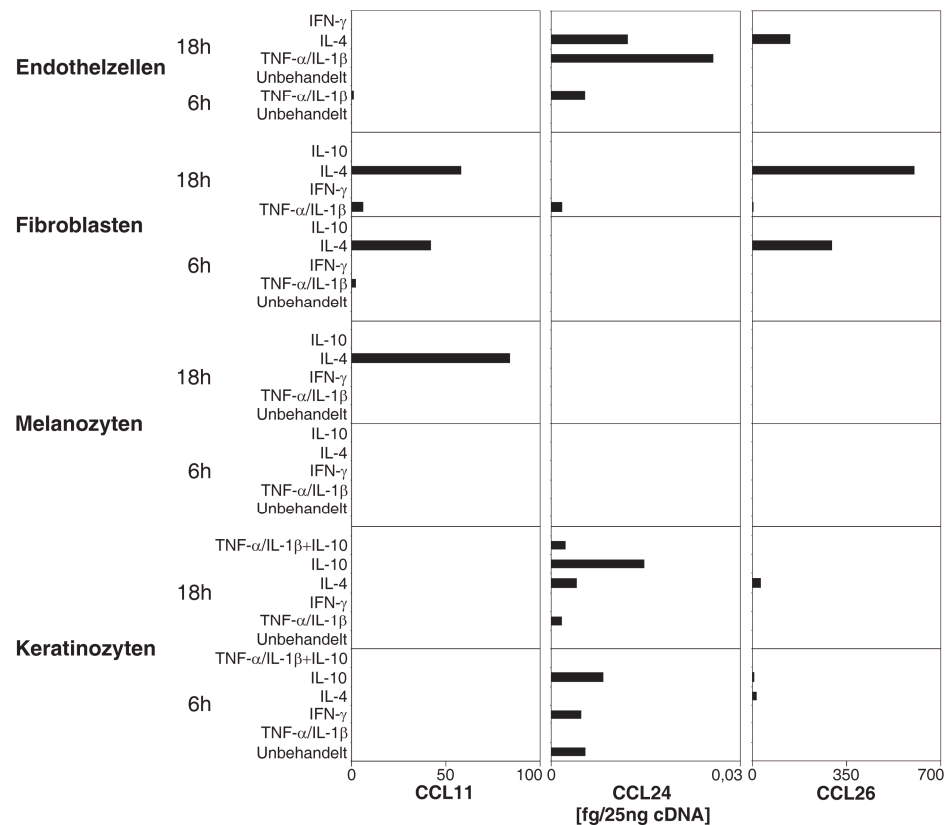


Abbildung 21: CCL11, CCL24 und CCL26 werden durch unterschiedliche T-Zell-assoziierte Zytokine reguliert. Humane, primäre Endothelzellen, dermale Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten wurden entweder mit IL-10, IL-4, IFN- γ und TNF- α /IL-1 β für 6 und 18 Stunden stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Chemokinexpression wurde mittels quantitativer real-time PCR bestimmt, die Werte sind in Femtogramm Zielgen pro 25 Nanogramm cDNA angegeben.

Um die Regulation von CCL26 während der Pathogenese der atopischen Dermatitis genauer zu untersuchen, wurden Patienten mit atopischer Dermatitis einem SEB-Patch-Test, einem Atopie-Patch-Test und einer mechanischen Hautreizung, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, unterzogen. Bei der Betrachtung der mechanischen Hautreizung, zeigte der Vergleich der gesunden Haut mit gesunder Haut von Atopikern eine Hochregulation von CCL26 in atopischen Individuen (Daten nicht gezeigt).

Bei der Betrachtung der mechanischen Hautreizung gelang lediglich zu zeigen, dass Patienten mit atopischer Dermatitis eine höhere CCL26-Expression aufwiesen, was die Atopie-Assoziation von CCL26 unterstreicht.

Bemerkenswerterweise zeigten jedoch Hautproben aus SEB-Patch-Tests eine Hochregulation von CCL26 in 4 von 6 Patienten 6-24 Stunden nach SEB-Exposition. Dieser Effekt ließ sich sowohl auf mRNA Ebene (Abbildung 22), als auch auf Proteinebene mittels Immunohistochemie (Abbildung 20 J-L) nachweisen.

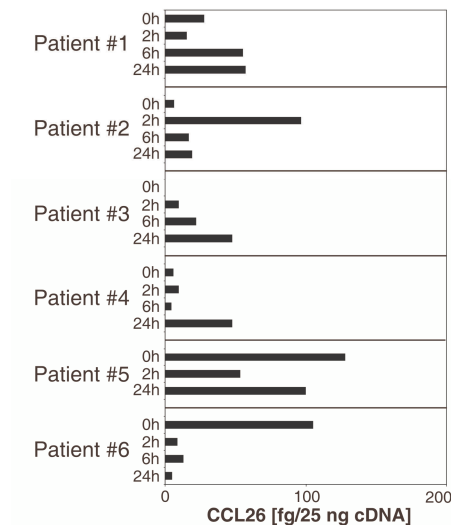


Abbildung 22: Superantigenexposition induziert die Expression von CCL26. Quantitative real-time PCR-Analyse von cDNA aus Hautbiopsien von Patienten mit atopischer Dermatitis, die im Rahmen eines SEB-Patch-Tests gewonnen wurde. Hautbiopsien wurden nach 0, 2, 6 und 24 stündiger SEB-Exposition entnommen. Werte sind in Femtogramm Zielgen in 25 Nanogramm cDNA angegeben.

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Staphylokokkenbesiedlung von Atopikern einen Schlüsselfaktor für die Regulation von CCL26 darstellt.

4 Diskussion

Atopische Störungen stellen eine Gruppe von Erkrankungen mit zunehmender Häufigkeit auftretender, multifaktorieller chronischer Erkrankungen dar, die entzündliche und degenerative Veränderungen in der Haut und in mucosalen Oberflächen hervorrufen. In Patienten mit atopischer Dermatitis spielen hautinfiltrierende Leukozyten eine wichtige Rolle in der Initiation und Aufrechterhaltung der atopischen Hautentzündung. Im inflammatorischen Infiltrat finden sich überwiegend CLA⁺ memory T-Zellen, Fcε-tragende dendritische Zellen und Eosinophile (Novak *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2004). Ein besseres Verständnis des Rekrutierungswegs dieser Zellen könnte dazu beitragen, neue Ansätze zur Diagnose, Prävention und Behandlung der atopischen Dermatitis zu finden. Es ist bekannt, dass eine Familie kleiner, zytokinähnlicher chemoattraktiver Proteine, die Chemokine, Leukozytenwanderung unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen beeinflussen (Luther *et al.*, 2002; Homey *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL26 und CCL27 als spezifisch in der atopischen Dermatitis regulierte Chemokine zu identifizieren.

Davon ist bisher bekannt, dass CCL17/*TARC* mRNA in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis verstärkt gebildet wird, wo es in Keratinozyten und Endothelzellen nachgewiesen wurde (Zheng *et al.*, 2003). In gesunder Haut konnte CCL17 nicht nachgewiesen werden. In unbehandelten Keratinozyten gelang ebenfalls kein Nachweis einer CCL17-Produktion *in vitro* (Tsuda *et al.*, 2003). Die Menge an CCL17-Protein im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis ist erhöht (Shimada *et al.*, 2004); es gelang zu zeigen, dass die Menge an CCL17 im Serum der Patienten mit atopischer Dermatitis mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Kakinuma *et al.*, 2001). Im Mausmodell wird CCL17 von Langerhans-Zellen exprimiert und durch das T_{H2}-Tytokin IL-4 und TNF-α herauf-, sowie durch das T_{H1}-Zytokin IFN-γ herunterreguliert (Xiao *et al.*, 2003).

Das „macrophage derived chemokine (*MDC*)“, oder CCL22 nach aktueller

Nomenklatur, stellt ein Chemoattraktanz für Monozyten, dendritische Zellen monozytärer Abstammung und NK-Zellen dar (Godiska *et al.*, 1997). CCL22 ist kürzlich wegen seiner in Patienten mit atopischer Dermatitis erhöhten Serumkonzentration, die mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Kakinuma *et al.*, 2002), als Atopie-Marker identifiziert worden (Leung *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 2004). Es wird von dendritischen Zellen (Vulcano *et al.*, 2001), CD40L-stimulierten B-Zellen (Lin *et al.*, 2003), stimulierten T-Zellen (Galli *et al.*, 2000) und humanen Keratinozyten nach Stimulation mit IFN- γ gebildet. Ob die Produktion von CCL22 einer T_H1-Antwort (Albanesi *et al.*, 2001) oder einer T_H2-Antwort (Galli *et al.*, 2000) zuzurechnen ist, wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Zudem gelang mittels Immunohistochemie und auf mRNA-Ebene der Nachweis von CCL22 in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (Horikawa *et al.*, 2002).

Von CCL27/CTACK weiss man, dass es in atopischen Entzündungen vorkommt und in Keratinozyten und auf der extrazellulären Matrix von Endothelzellen nachgewiesen wurde. Trotz seiner konstitutiven Expression in gesunder Haut steigt die Expression von CCL27 während der läsionalen Phase der atopischen Dermatitis an (Homey *et al.*, 2002). Sein Rezeptor, CCR10 (Homey *et al.*, 2000) findet sich auf hautinfiltrierenden Leukozyten. Im Rahmen eines *in vivo* Nickel-Patch-Tests konnte zudem die Rekrutierung von CCR10⁺-Leukozyten nach Hochregulation von CCL27 gezeigt werden (Homey *et al.*, 2002). Die Fähigkeit, hautinfiltrierende Leukozyten zu rekrutieren, wird von weiteren Studien bestätigt (Reiss *et al.*, 2001). In atopischer Dermatitis konnte zudem erhöhte Serumspiegel an CCL27 nachgewiesen werden (Kakinuma *et al.*, 2003).

Diese Beobachtungen in Hinblick auf CCL17, CCL22 und CCL27 sind ein guter Hinweis für die Validität der im Rahmen dieser Arbeit etablierten cDNA-Probensammlung für atopische Dermatitis, Psoriasis und Lupus erythematoses. Zusätzlich stützen sie die Validität der Auswertung mittels der „shrunk-centroid“-Methodik, da sie mit den Befunden bisheriger Studien übereinstimmen. Jene drei Chemokine, die bei dieser Analyse zusätzlich als Atopie-assoziiert identifiziert wurden - CCL1, CCL18 und CCL26 - sollen im Nachfolgenden eingehender beleuchtet werden.

4.1 CCL1

Wie bereits zu Beginn beschrieben, lassen sich die Angehörigen der Chemokinsuperfamilie in so genannte Cluster- und Nicht-Cluster-Chemokine unterteilen (Zlotnik *et al.*, 2000) (Abbildung 5). Auf dem Chromosom 17q11.2 findet sich ein großes CC-Liganden-Cluster. Die meisten Chemokine in diesem Cluster binden an die gleichen Rezeptoren – CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5. CCL1 ist das einzige in diesem Cluster vertretene Chemokin (Naruse *et al.*, 1996), welches spezifisch CCR8, also nur an einen einzigen Rezeptor, bindet. Dies könnte darauf hin deuten, dass CCL1 wichtige, nichtredundante Funktionen vermittelt.

Das in den letzten Jahren erworbene Verständnis für DNA-Viren und ihre Wirte zeigt, dass sich Viren während der Evolution durch komplexe Virus/Wirt-Interaktionen an das Immunsystem des Wirtes angepasst haben. Einige Viren haben virale Chemokinrezeptorantagonisten entwickelt, die es ermöglichen, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen. Eine wichtige Eigenschaft hierbei ist es, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, ohne die Lebensfähigkeit des Wirtes deutlich zu verschlechtern. Ein Beispiel hierfür ist das epidermotropische DNA-Virus *Molluscum contagiosum*, welches den viralen CCR8-Antagonisten MC148 produziert (Luttichau *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigen Patienten mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Frequenz an Infektionen mit *Molluscum contagiosum* (Wollenberg *et al.*, 2003), was darauf hin deuten könnte, dass dieses DNA-Virus sich an eine präferenziell CCL1-CCR8 gesteuerte Immunantwort in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis angepasst hat.

Kürzlich gelang es zu zeigen, dass CCL17/TARC selektiv in der atopischen Dermatitis exprimiert wird und die Serumspiegel von CCL17 mit der Schwere der Erkrankung in Patienten mit atopischer Dermatitis korreliert (Kakinuma *et al.*, 2001). CCL17 bindet an CCR4, das in großen Mengen präferenziell auf hautinfiltrierenden CD4⁺CLA⁺-T-Zellen exprimiert wird. Der derzeitige Stand der Forschung legt nahe, dass CCR4- und CCR10-Liganden bei der Rekrutierung von

hautinfiltrierenden CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Es ist jedoch wenig über die Rekrutierung von CD8⁺-T-Zellen in die Haut bekannt.

In Rahmen dieser Arbeit gelang es zu zeigen, dass durch Aktivierung von T-Zellen CCR8 auf die Oberfläche von CD8⁺-T-Zellen rekrutiert wird. Weiterhin beschreibt das synergistische Verhalten von CXCL12 und CCL1, welches CD8⁺-T-Zellen anlockt, einen neuen Signalweg für die Rekrutierung von CD8⁺-T-Zellen an Entzündungsherde. Dendritische Zellen und ihre Vorläufer exprimieren weder CCR4 noch CCR10, weswegen diese Rezeptoren die Akkumulation von dendritischen Zellen während atopischer Hautentzündungen nicht erklären können (Reiss *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 2003; Vestergaard *et al.*, 2003). Es gelang, zu zeigen, dass es sich bei CCL1 um ein Atopie-assoziiertes, inflammatorisches Chemokin handelt. Die erhöhten Serumspiegel von CCL1 während der läsionalen Phase weisen darauf hin, dass CCL1 zumindest zum Teil in die T_H2-vermittelte Hautentzündung involviert ist. Unter den zellulären Bestandteilen der Haut sind Endothelzellen, Mastzellen und Langerhans-Zellen die bedeutendsten Quellen für CCL1. Diese Beobachtungen unterstützen aktuelle Veröffentlichungen, die CCL1-CCR8 mit einem T_H2-Phänotyp (Zingoni *et al.*, 1998) in Verbindung bringen und zeigen, dass endotheliale Zellen und Langerhans-Zellen *in vivo* für die Produktion von CCL1 verantwortlich sind (Schaerli *et al.*, 2004).

Es gibt sich verdichtende Hinweise, aber keinen Nachweis, dass Macrophagen und dendritische Zellen ein Ziel für CCL1 darstellen. So zeigten kürzlich Mahd *et al.* (Mahad *et al.*, 2004), dass Makrophagen von Patienten, welche an multipler Sklerose erkrankt sind, erhebliche Mengen von CCR8 auf ihrer Oberfläche tragen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, zu zeigen, dass Monozyten, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen und eine kleine Subpopulation von zirkulierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen CCR8 auf ihrer Oberfläche tragen. Überraschenderweise konnte keine Migration dieser Zellen mit CCL1 allein gezeigt werden, jedoch konnte ein Synergismus zwischen CCL1 und CXCL12 bei der Rekrutierung von hautinfiltrierenden (CLA⁺) CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen *in vitro* gezeigt werden. Langerhans-Zellen im Besonderen migrieren als Antwort zu einem eng umgrenzten Feld an Chemokinen (CCL20, CXCL12 und in geringem

Umfang CCL5 und CCL7), was mit ihrem beschränkten Repertoire an Chemokinrezeptoren zusammenhängt (Dieu-Nosjean *et al.*, 2000). Da dendritische Zellen für die Initiation einer Immunantwort von großer Bedeutung sind, ist es denkbar, dass CCL1 eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Langerhans-Zellen in der atopischen Dermatitis spielt.

Im Vergleich dazu zeigen Monozyten nur eine geringe chemotaktische Reaktion auf CCL1 und CXCL12. Da Monozyten ein breites Spektrum an Chemokinrezeptoren besitzen, muss hier vermutet werden, dass Monozyten nach Kontakt mit anderen inflammatorischen Chemokinen aus dem Blutgefäßsystem in Entzündungsregionen wandern. Bemerkenswerterweise gelang es, nachzuweisen, dass CCL1 und CXCL12 *in vivo* an ähnlichen anatomischen Lokalisationen gebildet werden. Beide Zellen werden von Endothelzellen im superfiziellen dermalen Plexus gebildet, dendritische Zellen zeigen bei Patienten mit atopischer Dermatitis Immunreaktivität innerhalb des epidermalen Kompartiments. Damit besitzen beide Chemokine eine gute räumliche Ausgangsbasis für eine Kooperation bei der Rekrutierung von T-Zellen und dendritischen Zellen zu Arealen mit atopischen Hautentzündungen. Damit unterstützt diese Arbeit die These von Vanbervliet *et al.*, die davon ausgeht, dass das Zusammenspiel von inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten-Subpopulationen spielt. Vanbervliet *et al.* konnten zeigen, dass induzierbare inflammatorische Liganden von CXCR3 (CXCL9, 10 und 11) das Migrationsverhalten von plasmazytoiden dendritischen Zellen in Kooperation mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12 kontrollieren (Vanbervliet *et al.*, 2003).

Zudem stimmen Beobachtungen aus dieser Arbeit mit den Erkenntnissen von Schaerli *et al.* überein, die das Vorhandensein von CCR8 auf einer sehr kleinen Subpopulation von T-Zellen im peripheren Blut dokumentieren (Schaerli *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Schaerli *et al.*, die CCL1 auf Proteinebene in normaler Haut und dermalen Blutgefäßen nachgewiesen haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit dort weder mittels quantitativer real-time PCR noch Immunohistochemie eine signifikante Expression nachgewiesen werden.

Da minimale Mengen an CCR8⁺ Zellen in Form patrouillierender dendritischer Zellen in normaler Haut vorkommen, kann eine mögliche Funktion von CCL1 unter homöostatischen Bedingungen nicht völlig ausgeschlossen werden. Über die Beobachtungen von Schaerli et al. hinaus gelang es in dieser Arbeit zu zeigen, dass in der läsionalen Haut und im Serum von Patienten in der läsionalen Phase der atopischen Dermatitis eine verstärkte Expression von CCL1, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, vorliegt. Da es sowohl gelang, die CCL1 Expression nach Antigenkontakt *in vivo* zu erhöhen, als auch *in vitro* nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten und Kreuzvernetzung von IgE auf der Oberfläche von Mastzellen, ist davon auszugehen, dass CCL1 eine wichtige Rolle während der atopischen Hautentzündung spielt.

Weiterhin wurden die Effekte von mikrobiellen Produkten oder dem T-Zell-Signal CD40L auf die Regulation von CCR8 während der Differenzierung dendritischer Zellen betrachtet. Die CCR8-Expression wird während der frühen Differenzierung von Monozyten in interstitielle oder Langerhans-artige dendritische Zellen beibehalten, geht jedoch während der letzten Schritte der Differenzierung allmählich zurück.

T-Zell-Subpopulationen, interstitielle dendritische Zellen und Langerhans-Zellen tragen CCR8 auf ihrer Oberfläche, zeigen jedoch kein chemotaktisches Verhalten auf CCL1 allein. Zusammen mit CXCL12, mit dem CCL1 eine identische zelluläre Herkunft in der atopischen Dermatitis aufweist, kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der chemotaktischen Aktivität. Es konnte beobachtet werden, dass bei Zugabe von IL-4 die CCR8-Expression herunter reguliert wurde (Marie-Caroline Dieu-Nosjean, mündl. Mitteilung). Daher wäre es ein denkbares Modell, dass IL-4 die Reaktionsfähigkeit dendritischer Zellen auf CCL1 und CXCL12 zu Regulieren vermag. Zu Beginn der akuten Phase/T_H2-Phase der atopischen Dermatitis könnte die lokale Produktion von IL-4 durch T-Zellen und Mastzellen es dendritischen Zellen erlauben, auf andere Chemokine wie CCR7-Liganden (CCL19, CCL21) anzusprechen, die in lymphatischen Gefäßen vorkommen. Überraschenderweise, im Gegensatz zu den meisten Chemokinrezeptoren (CCR1, 2, 5 und 6), behalten dendritische Zellen ihre CCR8-Expression während der Anwesenheit von

mikrobiellen Produkten oder T-Zell-Signalen bei. Die Sekretion von großen Mengen CCL1 durch aktivierte dendritische Zellen kann zwei direkte Effekte haben: Erstens eine Selbst-Desensitivierung des CCR8-Rezeptors, was den Zellen erlaubt, antwortfähig gegenüber CCR7-Liganden zu bleiben. Gleichzeitig verstärkt CCL1 durch Rekrutierung weiterer CCR8⁺-Zellen zum Entzündungsort die Immunantwort. Zweitens ist denkbar, dass CCL1 während der Aktivierung dendritischer Zellen weitere Funktionen, ausser Migration und Zellrekrutierung, hat. CCL1 wurde als wirksamer anti-apoptotischer Faktor für Thymozyten beschrieben (Ruckes *et al.*, 2001). Dies gibt einen Hinweis, dass CCL1-CCR8-Interaktionen in der atopischen Dermatitis ebenfalls „Survival“-Signale an T-Zellen und dendritische Zellen geben könnten.

Zusammengefasst lässt sich aus dieser Arbeit und den Erkenntnissen der Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe ein Konzept vorschlagen, in dem ein Kontakt mit Allergen oder mikrobiellen Produkten (z. B. SEB aus *Staphylococcus aureus*) eine Hochregulation von CCL1 in Patienten mit atopischer Dermatitis auslöst, welche Gedächtnis-T-Zellen und Langerhans-Zellen in die Haut lockt und zu einer Akkumulation dieser Zellen in subepidermalen und intraepidermalen Lokalisationen führt. Da dendritische Zellen große Mengen CCL1 abgeben, könnten Interaktionen zwischen dendritischen und T-Zellen in den entzündeten Hautarealen stattfinden. Zusätzlich könnte CCL1 über CCR8 „Survival“-Signale vermitteln, die aktivierungsabhängige Apoptose von hautinfiltrierenden Leukozyten verhindert und so zu einer Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion beiträgt. So könnten CCL1 und CCR8 eine Achse bilden, welche Funktionen der erworbenen und der angeborenen Immunantwort verbindet, die für eine Akkumulation von relevanten Leukozytensubpopulationen zu den Herden atopischer Entzündungen sorgt und zur Initiierung und Aufrechterhaltung der atopischen Dermatitis beiträgt.

4.2 CCL18

Innerhalb der Chemokinsuperfamilie stellt CCL18 den Liganden dar, der in der

läsionalen atopischen Dermatitis am stärksten reguliert ist. CCL18 war bis zu 100-fach höher reguliert als CCL17, ein Chemokin, von dem zuvor berichtet wurde, dass es mit atopischer Haut assoziiert ist (Kakinuma *et al.*, 2001). Die opulente und spezifische Expression von CCL18 suggeriert eine bisher unbekannte Funktion in der atopischen Dermatitis. Das Gen, welches CCL18 kodiert, ist auf dem Chromosom 17q11.2 lokalisiert. Bis heute ist weder ein Rezeptor, noch ein Homolog in Nagern zu CCL18 bekannt. Dennoch zeigte eine DNA Microarray-Analyse in Javaner-Affen (*Macaca fascicularis*), dass CCL18 in einem Asthma-Modell für Affen eines der am stärksten hochregulierten Gene ist, was ein weiteres Indiz für die Verbindung von CCL18 mit atopischen Erkrankungen ist (Zou *et al.*, 2002). CCL18 wurde in Keimzentren und T-Zell-Arealen von Lymphknoten nachgewiesen, beides Orte, an denen primäre B- und T-Zell-Antworten initiiert werden (Lindhout *et al.*, 2001). Weiterhin ist CCL18 chemotaktisch für T-Zellen (Adema *et al.*, 1997), was nahe legt, dass dieses Chemokin eine Rolle bei der Organisation von T-Zell-Antworten spielt. Diese Idee wird von einer aktuellen Studie unterstützt, die zeigt, dass CCL18 antigenspezifische CD8⁺-T-Zell Antworten verbessert, wenn es zusammen mit Malaria-Vakzinen in Mäusen verabreicht wird (Bruna-Romero *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CCL18 in normaler Haut von gesunden Individuen und in der nichtläsionalen Haut von Atopikern nicht vorkommt, jedoch in läsionalen Hautpartien von Atopikern hoch exprimiert wird. Es wurde berichtet, dass CCL18-positive Zellen in der Dermis eine dendritische Morphologie zeigen und entweder gleichmäßig verteilt in dermalen Kompartimenten vorkommen, was ein Netzwerk von Zellen mit Wächterfunktion nahe legt, oder geballt in perivaskulären Taschen mit großer anatomischer Nähe zu hautinfiltrierenden Leukozyten. Innerhalb der Epidermis zeigten Langerhans-Zellen und Keratinozyten in der obersten Zellschicht Immunreaktivität für CCL18 (Pivarcsi *et al.*, 2004). Damit wird CCL18 auf Zellen exprimiert, die an der Schwelle zwischen Immunsystem und Umwelt ständig die Umgebung nach dem Vorkommen von fremden Antigenen überprüfen.

Im klinischen Alltag weisen Patienten mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Frequenz an mikrobiellen Infektionen auf. Gleichwohl gehen aktuelle Studien

davon aus, dass Stoffwechselprodukte von Staphylokokken eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Verstärkung atopischer Entzündungen spielen (Breuer *et al.*, 2000; Zollner *et al.*, 2000; Laouini *et al.*, 2003; Leung, 2003). In der Tat wird CCL18 in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis nach topischer SEB-Exposition *in vivo* signifikant hochreguliert. Darüber hinaus konnte durch Stimulation von PBMCs mit SEB *in vitro* eine deutliche CCL18-Expression erreicht werden (Pivarcsi *et al.*, 2004), was sich ebenfalls mit aktuellen Beobachtungen von Schutyser *et al.* deckt (Schutyser *et al.*, 2001). Obwohl CCL18-produzierende Zellen in gesunder und nichtläsionaler Haut von Atopikern fehlen, exprimieren ruhende interstitielle und Langerhans-artige dendritische Zellen monozytärer Abstammung konstitutiv CCL18 in großen Mengen, was den Eindruck erweckt, dass dies eine Folge der Kulturbedingungen der Zellen ist. In Monozyten konnte die Expression von CCL18 mit LPS, PRN, Mannan und dem T-Zell-Signal CD40L erhöht werden. T_H-Effektorzytokine und proinflammatorische Zytokine konnten zudem die Produktion von CCL18 in strukturellen Zellen der Haut, wie Keratinozyten und dermalen Fibroblasten, induzieren. Obwohl die Gesamtmenge an CCL18, die von strukturellen Zellen im Vergleich mit Langerhans-artigen und interstitiellen dendritischen Zellen produziert wird vergleichsweise gering ist, können von hautinfiltrierenden Effektor-T-Zellen abgegebene Zytokine zu einer opulenten CCL18-Produktion in der Haut während der akuten und chronischen Phase der atopischen Dermatitis beitragen (Grewe *et al.*, 1998). Im Bezug auf dendritische Zellen decken sich die Erkenntnisse dieser Arbeit mit Studien, welche die Expression von CCL18 sowohl durch unreife dendritische Zellen *in vitro* (Laouini *et al.*, 2003; Vulcano *et al.*, 2003) als auch durch Makrophagen in der Lunge und alveolare Epithelzellen *in vivo* (Leung, 2003) beschreiben, und erweitern das Verständnis über die Regulation und die pathophysiologische Rolle von CCL18 (Pardo *et al.*, 2001). Topische Exposition nichtläsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis mit relevantem Antigen induziert Hautläsionen, die einer atopischen Dermatitis ähneln, was für eine essenzielle Rolle von Allergenen als Auslösefaktor der atopischen Dermatitis spricht (Leung *et al.*, 2003). In der Tat wurde CCL18 *in vivo* im Atopie-Patch-Test in Hautbiopsien von

Patienten mit atopischer Dermatitis nach topischer Exposition von Hausstaubmilben-Allergen aus *D. pteronyssimus* und *D. farinae* signifikant hochreguliert. In Ergänzung dazu gelang es, zu zeigen, dass die Stimulation dermalen Einzelzellsuspensionen mit dem rekombinanten Hausstaubmilben-Allergen *Der p 2* eine deutliche Induktion der CCL18-Produktion verursachte, was auf eine Funktion dieses Chemokins in der allergen-spezifischen Immunantwort hinweist (Pivarcsi *et al.*, 2004). Die Allergen-Spezifität der CCL18-Induktion wird zusätzlich durch eine CCL18-Regulation in haptensinduzierter allergischer Entzündung unterstrichen, die jedoch in chemisch induzierter Hautirritation unterbleibt (Pivarcsi *et al.*, 2004). Zusammengefasst suggerieren die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass Exposition mit Allergenen und mikrobiellen Produkten die CCL18-Produktion in Atopikern induziert und dieses die Rekrutierung von T-Zellen und deren Begegnung mit allergen- oder superantigenbeladenen dendritischen Zellen vermittelt. Nachfolgend könnten Effektormediatoren wie IL-4, IFN- γ oder CD40L aus aktivierten T-Zellen die CCL18-Produktion und die atopische Entzündung verstärken.

Als Schlussfolgerung stellt CCL18 ein Atopie-assoziiertes Chemokin dar, welches von Zellen, die an der Schwelle zwischen Umwelt und Immunsystem patrouillieren, sezerniert wird und durch antigene und mikrobielle Produkte reguliert wird. Daher kann CCL18 eine wichtige Rolle bei der Initiation und Amplifikation von atopischen Hautentzündungen spielen.

4.3 CCL26

CCL26 stellt einen Vertreter der Eotaxin-Familie dar, über deren Vertreter und deren Bedeutung in der Pathogenese der atopischen Dermatitis bereits in vorhergehenden Studien (Yawalkar *et al.*, 1999; Menzies-Gow *et al.*, 2002; Kagami *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2003) diskutiert wurde. Greift man das Konzept der „Cluster“-Chemokine aus Abbildung 5 erneut auf, so stellt die Eotaxin-Familie mit ihren Liganden CCL11, der auf dem Chromosom 17 (Kitaura *et al.*, 1996) lokalisiert ist, CCL24 und CCL26, die sich in einem größeren Gen-Cluster auf dem

Chromosom 7q11.23 befinden, und ihrem promiskuitivem Rezeptor CCR3 (Kitauro *et al.*, 1999) das Gegenteil zu der exklusiven Interaktion zwischen CCL1 und CCR8 dar.

Bereits zuvor behaupteten Yawalkar *et al.*, CCL11 in der Haut von Patienten mit läsionaler atopischer Dermatitis auf mRNA und Proteinebene gezeigt zu haben (Yawalkar *et al.*, 1999), was auf Grundlage der durchgeführten quantitativen real-time PCR nicht bestätigt werden konnte. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CCL26 selektiv erhöht im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis vorliegt und mit der Schwere der Erkrankung korreliert, nicht jedoch CCL24 (Kakinuma *et al.*, 2001; Kagami *et al.*, 2003). Weitere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass CCL11 ebenfalls im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis verstärkt vorkommt (Hossny *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2003). Diese Arbeit erweitert diese früheren Studien um die Erkenntnis, dass die CCL26 Produktion in läsionalen Hautpartien der atopischen Dermatitis im Vergleich mit normaler Haut und solcher von Patienten mit Psoriasis und Lupus Erythematoses selektiv und signifikant erhöht ist.

Dadurch, dass es gelingt zu zeigen, dass CCL26 ein inflammatorisches und atopie-assoziiertes Chemokin darstellt, wird die Idee, dass CCL26 möglicherweise als Marker für atopische Dermatitis Verwendung finden kann, unterstützt.

Unter den zellulären Bestandteilen der Haut *in vitro* sind die Hauptquellen für die Mitglieder der Eotaxin-Familie Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten. Interessanterweise werden CCL11 und CCL26 exklusiv durch Aktivierung mit dem T_H2-Zytokin IL-4 induziert. Diese Beobachtung wird gestützt von Arbeiten von Schroder *et al.* (Schroder *et al.*, 1996), wo beobachtet werden konnte, dass CCL11 von IL-4-stimulierten Fibroblasten produziert wurde, und von einer Studie von Shinkai *et al.*, denen es gelang zu zeigen, dass CCL26 in einer zeit- und konzentrationsabhängigen Art und Weise in Nabelschnur-Endothelzellen nach IL-4-Stimulation exprimiert wurde (Shinkai *et al.*, 1999). CCL24 konnte nur in geringen Mengen auf mRNA-Ebene in strukturellen Hautzellen nachgewiesen werden, wobei es *in vitro* sowohl nach Stimulation mit dem T_H2-Zytokin IL-10, als

auch mit dem T_H1-Zytokin IFN- γ oder den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α /IL-1 β nachgewiesen werden konnte.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass CCL11 und CCL26 eine T_H2-Assoziation aufweisen, während CCL24 sich nicht exklusiv einer T_H1- oder T_H2-Antwort zuordnen lässt.

Es gibt vermehrte Hinweise, dass Basophile (Sallusto *et al.*, 1997), Eosinophile (Hochstetter *et al.*, 2000), T_H2-Zellen (Sallusto *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003) und Keratinozyten mögliche Ziele für CCL26-CCR3-Interaktionen darstellen. Kürzlich zeigten Petering *et al.* (Petering *et al.*, 2001) einen Gradienten in der CCR3-Expression in Keratinozyten in den basalen Ebenen der Epidermis, was sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit überschneidet. Weiterhin gelang es, CCL26 in oberen Schichten der Keratinozyten in der Epidermis der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis zu zeigen. Hier kann also spekuliert werden, dass CCL26 nicht nur eine Funktion in der Rekrutierung von Basophilen, Eosinophilen und T_H2-Zellen besitzt, sondern darüber hinaus eine Funktion bei der Verdickung der Epidermis besitzt, die typisch für die läsionale atopische Haut (Abbildung 2) ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu einem Vorschlag eines Konzeptes, in dem die CCL26-Produktion durch mikrobielle Produkte, welche durch die in Atopikern häufige Staphylokokkenbesiedlung entstehen, ausgelöst wird. CCL26 rekrutiert über seinen Rezeptor CCR3 Basophile und Eosinophile sowie T_H2-Zellen. Dabei kann es durch die T_H2-zytokinassoziierte Induktion von CCL26 zu einer Amplifikation der CCL26-Produktion und einer Akkumulation der durch CCL26 rekrutierten Zellen in subepidermalen und epidermalen Kompartimenten kommen. Durch die Verteilung von Chemokin und Rezeptor in gegensätzlich verlaufenden Gradienten in der Epidermis ist zudem eine Funktion bei der Verdickung der atopischen Haut denkbar.

Daher spielt CCL26 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von relevanten Leukozyten zu den Lokalisationen atopischer Hautentzündungen und unterstützt die Initiation und Amplifikation der atopischen Dermatitis.

Betrachtet man abschließend noch einmal die Expression der Chemokinsuperfamilie in der atopischen Dermatitis, so bleiben CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL26 und CCL27 nicht nur als spezifisch mit der atopischen Dermatitis assoziierte Chemokine zurück, sondern auch als potenzielle Zielmoleküle für eine moderne, auf Chemokin- und Chemokinrezeptorantagonisten basierende Langzeittherapie für Patienten mit atopischer Dermatitis. Diese Antagonisten sind Werkzeuge, mit denen sich selektiv das Einwandern relevanter Leukozytensubpopulationen in Haut zu verhindern. Dass Chemokin- und Chemokinrezeptorantagonisten eine effektive und potentiell nebenwirkungsarme Option sind, wird von der Anpassung von hautassoziierten Viren wie dem Molluscum contagiosum Virus oder dem humanen Herpesvirus-8 (HHV8) unterstrichen, die Antagonisten wie MC148 oder das virale Chemokin vMIP-II entwickelt haben, um so an Chemokinrezeptoren gekoppelte Signalwege, in diesem Fall CCR8 und CCR10 zu blockieren und so einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (Lindow *et al.*, 2003).

Chemokine und Chemokinrezeptoren sind jedoch nicht nur Ziele für Antagonisten, sondern besitzen auch als Adjuvantien in der Immuntherapie bisher unvollständig erschlossenes Potential, beispielsweise als Hoffnung zur Verbesserung der zellvermittelten Immunität der Malaria (Bruna-Romero *et al.*, 2003) als auch in der Immuntherapie von Tumoren (Homey *et al.*, 2002).

Zusammenfassend sind die Chemokinsuperfamilie und ihre Rezeptoren interessante Ziele, um pharmakologisch in die Pathogenese von Erkrankungen einzugreifen.

5 Zusammenfassung

Atopische Dermatitis ist eine chronische Erkrankung der Haut mit einer stetig steigenden Prävalenz von 10-20%, die zu starken Beeinträchtigungen der Betroffenen wie auch erheblichen ökonomischen Schäden führt. Dank der vollständigen Kartierung und Klonierung der Chemokinsuperfamilie ist es erstmals möglich, alle Vertreter dieser Superfamilie 8-12 kDa großer, löslicher Proteine zu identifizieren, die mit dem Krankheitsbild der atopischen Dermatitis assoziiert sind.

Durch den mit Hilfe der quantitativen real-time PCR durchgeführten molekularbiologischen Vergleich von Hautproben aus Patienten mit atopischer Dermatitis, Psoriasis und Lupus erythematodes gelang es, CCL1, CCL17, CCL18, CCL26 und CCL27 als Atopie-assoziierte Chemokine zu identifizieren.

Durch Atopie-Patch-Tests und *in vitro*-Migrationsversuche konnte demonstriert werden, dass CCL1-CCR8-Interaktionen *in vivo* und *in vitro* T-Zellen und Langerhans-artige Zellen an den Ort atopischer Hautentzündungen rekrutieren können.

In Bezug auf CCL18 gelang es, zu zeigen, dass CCL18 spezifisch in atopischer Dermatitis assoziiert ist und *in vivo* durch Staphylokokken-Superantigen und Allergenexposition reguliert wird.

CCL26 stellte sich als einziges Atopie-assoziiertes Chemokin der Eotaxin-Familie heraus und weist eine Regulation durch T_H2 -Zytokine auf.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen folgt, dass die Chemokinsuperfamilie mit ihren Mitgliedern CCL1, CCL17, CCL18, CCL26 und CCL27 sowie die zugehörigen Rezeptoren interessante Zielmoleküle bietet, um pharmakologisch in die Pathophysiologie der atopischen Dermatitis einzugreifen und so langfristig die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern.

6 Lebenslauf

Name	Michael Gombert
Geburtsdatum	25.6.1974
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1980-1984	Erich-Kästner-Grundschule, Berliner-Str., Ratingen
1984-1993	Dietrich-Bonhoeffer-Schule, Städtisches Gymnasium, Erfurter Str., Ratingen; Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1993-10/2001	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Abschluß: Diplom
1/2002-12/2004	Promotionsstudium in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

7 Literaturverzeichnis

- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon und C. G. Figdor** (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." Nature **387**(6634): 713-7.
- Albanesi, C., C. Scarponi, S. Sebastiani, A. Cavani, M. Federici, S. Sozzani und G. Girolomoni** (2001). "A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases." J Leukoc Biol **70**(4): 617-23.
- Benyon, R. C., M. K. Church, L. S. Clegg und S. T. Holgate** (1986). "Dispersion and characterisation of mast cells from human skin." Int Arch Allergy Appl Immunol **79**(3): 332-4.
- Breuer, K., M. Wittmann, B. Bosche, A. Kapp und T. Werfel** (2000). "Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB)." Allergy **55**(6): 551-5.
- Bruna-Romero, O., J. Schmieg, M. Del Val, M. Buschle und M. Tsuji** (2003). "The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria." J Immunol **170**(6): 3195-203.
- Butcher, E. C. und L. J. Picker** (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.
- Campbell, J. J. und E. C. Butcher** (2000). "Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing." Curr Opin Immunol **12**(3): 336-41.
- Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik und A. Vicari** (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 345-69.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem

162(1): 156-9.

- David, N. B., D. Sapede, L. Saint-Etienne, C. Thisse, B. Thisse, C. Dambly-Chaudiere, F. M. Rosa und A. Ghysen** (2002). "Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16297-302.
- Dent, G., C. Hadjicharalambous, T. Yoshikawa, R. L. Handy, J. Powell, I. K. Anderson, R. Louis, D. E. Davies und R. Djukanovic** (2004). "Contribution of eotaxin-1 to eosinophil chemotactic activity of moderate and severe asthmatic sputum." Am J Respir Crit Care Med **169**(10): 1110-7.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque und C. Caux** (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik und C. Caux** (2000). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." J Exp Med **192**(5): 705-18.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, W. H. Fridman und C. Caux** (2001). "IL-10 induces CCR6 expression during Langerhans cell development while IL-4 and IFN-gamma suppress it." J Immunol **167**(10): 5594-602.
- Galli, G., D. Chantry, F. Annunziato, P. Romagnani, L. Cosmi, E. Lazzeri, R. Manetti, E. Maggi, P. W. Gray und S. Romagnani** (2000). "Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines." Eur J Immunol **30**(1): 204-10.
- Garrone, P., E. M. Neidhardt, E. Garcia, L. Galibert, C. van Kooten und J. Banchereau** (1995). "Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes." J Exp Med **182**(5): 1265-73.

Giustizieri, M. L., F. Mascia, A. Frezzolini, O. De Pita, L. M. Chinni, A.

Giannetti, G. Girolomoni und S. Pastore (2001). "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 **107**(5): 871-7.

Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A.

Mantovani und P. W. Gray (1997). "Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells." J Exp Med **185**(9): 1595-604.

Grewe, M., C. A. Bruijnzeel-Koomen, E. Schopf, T. Thepen, A. G. Langeveld-

Wildschut, T. Ruzicka und J. Krutmann (1998). "A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis." Immunol Today **19**(8): 359-61.

Grewe, M., K. Gyufko, E. Schopf und J. Krutmann (1994). "Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema." Lancet **343**(8888): 25-6.

Grewe, M., S. Walther, K. Gyufko, W. Czech, E. Schopf und J. Krutmann

(1995). "Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients." J Invest Dermatol **105**(3): 407-10.

Hanifin, J. M. und G. Rajka (1980). "Diagnostic criteria of atopic dermatitis." Acta Dermatovener Suppl.(92): 44-47.

Hochstetter, R., G. Dobos, D. Kimmig, Y. Dulkys, A. Kapp und J. Elsner

(2000). "The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils." Eur J Immunol **30**(10): 2759-64.

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 und A. Zlotnik (2002). "CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation." Nat Med **8**(2): 157-65.

- Homey, B. und E. Bunemann** (2004). "Chemokines and inflammatory skin diseases." Ernst Schering Res Found Workshop(45): 69-83.
- 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 und A. Zlotnik** (2000). "Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis." J Immunol **164**(12): 6621-32.
- Homey, B., A. Muller und A. Zlotnik** (2002). "Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer?" Nat Rev Immunol **2**(3): 175-84.
- 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 und A. Zlotnik** (2000). "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 **164**(7): 3465-70.
- Homey, B. und A. Zlotnik** (1999). "Chemokines in allergy." Curr Opin Immunol **11**(6): 626-34.
- Horikawa, T., T. Nakayama, I. Hikita, H. Yamada, R. Fujisawa, T. Bito, S. Harada, A. Fukunaga, D. Chantry, P. W. Gray, A. Morita, R. Suzuki, T. Tezuka, M. Ichihashi und O. Yoshie** (2002). "IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis." Int Immunol **14**(7): 767-73.
- Hossny, E., M. Aboul-Magd und S. Bakr** (2001). "Increased plasma eotaxin in atopic dermatitis and acute urticaria in infants and children." Allergy **56**(10): 996-1002.
- Imokawa, G.** (2001). "Lipid abnormalities in atopic dermatitis." J Am Acad Dermatol **45**(1 Suppl): S29-32.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport und M. Shlomchik** (2002).

Immunologie. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.

- Kagami, S., T. Kakinuma, H. Saeki, Y. Tsunemi, H. Fujita, K. Nakamura, T. Takekoshi, M. Kishimoto, H. Mitsui, H. Torii, M. Komine, A. Asahina und K. Tamaki** (2003). "Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis." Clin Exp Immunol **134**(2): 309-13.
- Kakinuma, T., K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, A. Asahina, N. Onai, K. Matsushima und K. Tamaki** (2001). "Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity." J Allergy Clin Immunol **107**(3): 535-41.
- Kakinuma, T., K. Nakamura, M. Wakugawa, H. Mitsui, Y. Tada, H. Saeki, H. Torii, M. Komine, A. Asahina und K. Tamaki** (2002). "Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis." Clin Exp Immunol **127**(2): 270-3.
- 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 und K. Tamaki** (2003). "Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris." J Allergy Clin Immunol **111**(3): 592-7.
- Kemeny, L., T. Ruzicka, A. Dobozy und G. Michel** (1994). "Role of interleukin-8 receptor in skin." Int Arch Allergy Immunol **104**(4): 317-22.
- Kitaura, M., T. Nakajima, T. Imai, S. Harada, C. Combadiere, H. L. Tiffany, P. M. Murphy und O. Yoshie** (1996). "Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3." J Biol Chem **271**(13): 7725-30.
- Kitaura, M., N. Suzuki, T. Imai, S. Takagi, R. Suzuki, T. Nakajima, K. Hirai, H. Nomiya und O. Yoshie** (1999). "Molecular cloning of a novel human CC

chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3." J Biol Chem **274**(39): 27975-80.

Knaut, H., C. Werz, R. Geisler und C. Nusslein-Volhard (2003). "A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor." Nature **421**(6920): 279-82.

Langeveld-Wildschut, E. G., P. L. Bruijnzeel, G. C. Mudde, C. Versluis, A. G. Van Ieperen-Van Dijk, I. C. Bihari, E. F. Knol, T. Thepen, C. A. Bruijnzeel-Koomen und F. C. van Reijssen (2000). "Clinical and immunologic variables in skin of patients with atopic eczema and either positive or negative atopy patch test reactions." J Allergy Clin Immunol **105**(5): 1008-16.

Laouini, D., S. Kawamoto, A. Yalcindag, P. Bryce, E. Mizoguchi, H. Oettgen und R. S. Geha (2003). "Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation." J Allergy Clin Immunol **112**(5): 981-7.

Lee, S. C., M. E. Brummet, S. Shahabuddin, T. G. Woodworth, S. N. Georas, K. M. Leiferman, S. C. Gilman, C. Stellato, R. P. Gladue, R. P. Schleimer und L. A. Beck (2000). "Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes." J Immunol **164**(6): 3392-401.

Leung, D. Y. (2003). "Infection in atopic dermatitis." Curr Opin Pediatr **15**(4): 399-404.

Leung, D. Y. und T. Bieber (2003). "Atopic dermatitis." Lancet **361**(9352): 151-60.

Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura und Q. A. Hamid (2004). "New insights into atopic dermatitis." J Clin Invest **113**(5): 651-7.

Leung, T. F., K. C. Ma, K. L. Hon, C. W. Lam, H. Wan, C. Y. Li und I. H. Chan (2003). "Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children." Pediatr Allergy Immunol **14**(4): 296-301.

Lever, R., C. MacDonald, P. Waugh und T. Aitchison (1998). "Randomised controlled trial of advice on an egg exclusion diet in young children with

atopic eczema and sensitivity to eggs." Pediatr Allergy Immunol **9**(1): 13-9.

Liao, F., R. L. Rabin, C. S. Smith, G. Sharma, T. B. Nutman und J. M. Farber (1999). "CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha." J Immunol **162**(1): 186-94.

Lin, L., S. Nonoyama, A. Oshiba, Y. Kabasawa und S. Mizutani (2003). "TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients." J Med Dent Sci **50**(1): 27-33.

Lindhout, E., J. L. Vissers, F. C. Hartgers, R. J. Huijbens, N. M. Scharenborg, C. G. Figdor und G. J. Adema (2001). "The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes." J Immunol **166**(5): 3284-9.

Lindow, M., H. R. Luttichau und T. W. Schwartz (2003). "Viral leads for chemokine-modulatory drugs." Trends Pharmacol Sci **24**(3): 126-30.

Luther, S. A., A. Bidgol, D. C. Hargreaves, A. Schmidt, Y. Xu, J. Paniyadi, M. Matloubian und J. G. Cyster (2002). "Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis." J Immunol **169**(1): 424-33.

Luttichau, H. R., J. Stine, T. P. Boesen, A. H. Johnsen, D. Chantry, J. Gerstoft und T. W. Schwartz (2000). "A highly selective CC chemokine receptor (CCR)8 antagonist encoded by the poxvirus molluscum contagiosum." J Exp Med **191**(1): 171-80.

Maghazachi, A. A. (2003). "G protein-coupled receptors in natural killer cells." J Leukoc Biol **74**(1): 16-24.

Mahad, D., C. Trebst, S. M. Staugaitis, P. Kivisakk, B. Tucky, T. Wei, R. Horuk und R. M. Ransohoff (2004). "Preliminary observations on CC chemokine receptor expression by mononuclear phagocytes in multiple sclerosis lesions: effect of lesion heterogeneity." Ernst Schering Res Found

Workshop(45): 59-68.

Menzies-Gow, A., S. Ying, I. Sabroe, V. L. Stubbs, D. Soler, T. J. Williams und A. B. Kay (2002). "Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers." J Immunol **169**(5): 2712-8.

Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui und A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.

Naruse, K., M. Ueno, T. Satoh, H. Nomiyama, H. Tei, M. Takeda, D. H. Ledbetter, E. V. Coillie, G. Opdenakker, N. Gunge, Y. Sakaki, M. Iio und R. Miura (1996). "A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2." Genomics **34**(2): 236-40.

Novak, N., S. Kraft und T. Bieber (2001). "IgE receptors." Curr Opin Immunol **13**(6): 721-6.

Novak, N., R. Valenta, B. Bohle, S. Laffer, J. Haberstok, S. Kraft und T. Bieber (2004). "FcεpsilonRI 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 **113**(5): 949-57.

Ostlere, L. S., T. Cowen und M. H. Rustin (1995). "Neuropeptides in the skin of patients with atopic dermatitis." Clin Exp Dermatol **20**(6): 462-7.

Pardo, A., K. M. Smith, J. Abrams, R. Coffman, M. Bustos, T. K. McClanahan, J. Grein, E. E. Murphy, A. Zlotnik und M. Selman (2001). "CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis." J Leukoc Biol **70**(4): 610-6.

Petering, H., C. Kluthe, Y. Dulkys, P. Kiehl, P. D. Ponath, A. Kapp und J. Elsner (2001). "Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human

keratinocytes." J Invest Dermatol **116**(4): 549-55.

Picker, L. J., L. W. Terstappen, L. S. Rott, P. R. Streeter, H. Stein und E. C. Butcher (1990). "Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man." J Immunol **145**(10): 3247-55.

Pivarcsi, A., M. Gombert, M. C. Dieu-Nosjean, A. Lauerma, R. Kubitza, S. Meller, J. Rieker, A. Muller, L. Da Cunha, A. Haahtela, E. Sonkoly, W. H. Fridman, H. Alenius, L. Kemeny, T. Ruzicka, A. Zlotnik und B. Homey (2004). "CC Chemokine Ligand 18, An Atopic Dermatitis-Associated and Dendritic Cell-Derived Chemokine, Is Regulated by Staphylococcal Products and Allergen Exposure." J Immunol **173**(9): 5810-7.

Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell und E. C. Butcher (2001). "CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin." J Exp Med **194**(10): 1541-7.

Rho, N. K., W. S. Kim, D. Y. Lee, J. H. Lee, E. S. Lee und J. M. Yang (2004). "Immunophenotyping of inflammatory cells in lesional skin of the extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis." Br J Dermatol **151**(1): 119-25.

Rossi, D. und A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.

Ruckes, T., D. Saul, J. Van Snick, O. Hermine und R. Grassmann (2001). "Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309." Blood **98**(4): 1150-9.

Ruzicka, T., T. Bieber, E. Schopf, A. Rubins, A. Dobozy, J. D. Bos, S. Jablonska, I. Ahmed, K. Thestrup-Pedersen, F. Daniel, A. Finzi und S. Reitamo (1997). "A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. European Tacrolimus Multicenter Atopic Dermatitis Study Group." N Engl J Med **337**(12): 816-21.

Sallusto, F. und A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and

- downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., C. R. Mackay und A. Lanzavecchia** (1997). "Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells." Science **277**(5334): 2005-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.,** (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbour Laboratory Press New York, USA.
- Sampson, H. A.** (1999). "Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders." J Allergy Clin Immunol **103**(5 Pt 1): 717-28.
- Schaerli, P., L. Ebert, K. Willmann, A. Blaser, R. S. Roos, P. Loetscher und B. Moser** (2004). "A Skin-selective Homing Mechanism for Human Immune Surveillance T Cells." J Exp Med **199**(9): 1265-75.
- Schroder, J. M., N. Noso, M. Sticherling und E. Christophers** (1996). "Role of eosinophil-chemotactic C-C chemokines in cutaneous inflammation." J Leukoc Biol **59**(1): 1-5.
- Schutyser, E., S. Struyf, A. Wuyts, W. Put, K. Geboes, B. Grillet, G. Opdenakker und J. Van Damme** (2001). "Selective induction of CCL18/PARC by staphylococcal enterotoxins in mononuclear cells and enhanced levels in septic and rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **31**(12): 3755-62.
- Shimada, Y., K. Takehara und S. Sato** (2004). "Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis." J Dermatol Sci **34**(3): 201-8.
- Shinkai, A., H. Yoshisue, M. Koike, E. Shoji, S. Nakagawa, A. Saito, T. Takeda, S. Imabeppu, Y. Kato, N. Hanai, H. Anazawa, T. Kuga und T. Nishi** (1999). "A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils." J Immunol **163**(3): 1602-10.
- Simon, D., L. R. Braathen und H. U. Simon** (2004). "Eosinophils and atopic dermatitis." Allergy **59**(6): 561-70.
- Soler, D., T. L. Humphreys, S. M. Spinola und J. J. Campbell** (2003). "CCR4

- versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking." Blood **101**(5): 1677-82. Epub 2002 Oct 24.
- Spergel, J. M. und A. S. Paller** (2003). "Atopic dermatitis and the atopic march." J Allergy Clin Immunol **112**(6 Suppl): S118-27.
- Tibshirani, R., T. Hastie, B. Narasimhan und G. Chu** (2002). "Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6567-72.
- Tsuda, T., M. Tohyama, K. Yamasaki, Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, K. Sayama und K. Hashimoto** (2003). "Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro." J Dermatol Sci **31**(1): 37-42.
- Tupker, R. A., J. G. De Monchy, P. J. Coenraads, A. Homan und J. B. van der Meer** (1996). "Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite." J Allergy Clin Immunol **97**(5): 1064-70.
- Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. De Bouteiller, F. Briere, G. Trinchieri und C. Caux** (2003). "The Inducible CXCR3 Ligands Control Plasmacytoid Dendritic Cell Responsiveness to the Constitutive Chemokine Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1)/CXCL12." J Exp Med **198**(5): 823-30.
- Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari und C. Caux** (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." Eur J Immunol **32**(1): 231-42.
- Verboom, P., L. Hakkaart-Van, M. Sturkenboom, R. De Zeeuw, H. Menke und F. Rutten** (2002). "The cost of atopic dermatitis in the Netherlands: an international comparison." Br J Dermatol **147**(4): 716-24.
- Vestergaard, C., M. Deleuran, B. Gesser und C. Gronhoj Larsen** (2003). "Expression of the T-helper 2-specific chemokine receptor CCR4 on CCR10-positive lymphocytes in atopic dermatitis skin but not in psoriasis skin." Br J Dermatol **149**(3): 457-63.

- Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrando, G. Girolomoni, A. Mantovani und S. Sozzani** (2001). "Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo." Eur J Immunol **31**(3): 812-22.
- Vulcano, M., S. Struyf, P. Scapini, M. Cassatella, S. Bernasconi, R. Bonecchi, A. Calleri, G. Penna, L. Adorini, W. Luini, A. Mantovani, J. Van Damme und S. Sozzani** (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." J Immunol **170**(7): 3843-9.
- Wang, C. R., P. C. Chen und M. F. Liu** (2003). "Increased circulating CCR3+ type 2 helper T cells in house dust mite-sensitive Chinese patients with allergic diseases." Asian Pac J Allergy Immunol **21**(4): 205-10.
- Werfel, T., A. Morita, M. Grewe, H. Renz, U. Wahn, J. Krutmann und A. Kapp** (1996). "Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis." J Invest Dermatol **107**(6): 871-6.
- Wollenberg, A., S. Wetzel, W. H. Burgdorf und J. Haas** (2003). "Viral infections in atopic dermatitis: pathogenic aspects and clinical management." J Allergy Clin Immunol **112**(4): 667-74.
- Woodward, A. L., J. M. Spergel, H. Alenius, E. Mizoguchi, A. K. Bhan, E. Castigli, S. R. Brodeur, H. C. Oettgen und R. S. Geha** (2001). "An obligate role for T-cell receptor alphabeta+ T cells but not T-cell receptor gammadelta+ T cells, B cells, or CD40/CD40L interactions in a mouse model of atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **107**(2): 359-66.
- Xiao, T., H. Fujita, H. Saeki, H. Mitsui, M. Sugaya, Y. Tada, T. Kakinuma, H. Torii, K. Nakamura, A. Asahina und K. Tamaki** (2003). "Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF-alpha and IL-4 and downregulated by IFN-gamma." Cytokine **23**(4-5): 126-32.
- Yawalkar, N., M. Uguccioni, J. Scharer, J. Braunwalder, S. Karlen, B. Dewald,**

- L. R. Braathen und M. Baggiolini** (1999). "Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis." J Invest Dermatol **113**(1): 43-8.
- Zheng, X., K. Nakamura, H. Furukawa, A. Nishibu, M. Takahashi, M. Tojo, F. Kaneko, T. Kakinuma und K. Tamaki** (2003). "Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis." J Dermatol **30**(1): 26-32.
- Zingoni, A., H. Soto, J. A. Hedrick, A. Stoppacciaro, C. T. Storlazzi, F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, A. O'Garra, D. Robinson, M. Rocchi, A. Santoni, A. Zlotnik und M. Napolitano** (1998). "The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells." J Immunol **161**(2): 547-51.
- Zlotnik, A. und O. Yoshie** (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.
- Zollner, T. M., T. A. Wichelhaus, A. Hartung, C. Von Mallinckrodt, T. O. Wagner, V. Brade und R. Kaufmann** (2000). "Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis." Clin Exp Allergy **30**(7): 994-1000.
- Zou, J., S. Young, F. Zhu, F. Gheyas, S. Skeans, Y. Wan, L. Wang, W. Ding, M. Billah, T. McClanahan, R. L. Coffman, R. Egan und S. Umland** (2002). "Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma." Genome Biol **3**(5): research0020.