

Chemokine: Endogene Mediatoren der allergenisierenden und irritativen Potenz von Chemikalien.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franziska Winterberg
aus Essen

Düsseldorf
2005

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2005

Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey für die Vergabe des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Antti Lauerma für die Bereitstellung der NiSO₄- und SLS-Patch-Test Proben und das Generieren der T-Zellklone.

Michael Gombert, der mir bei allen Problemen rund um den Computer sehr geduldig zu Seite stand.

Erich Bünemann für die Klärung von organisatorischen Fragen.

Robert Kubitza für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistochemie.

Ulrike Wiesner für die gute Einarbeitung in die Zellkultur zu Beginn der Arbeit.

Dr. Andor Pivarcsi und Enikő Sonkoly für die anregenden Gespräche, die unter anderem meinen englischen Sprachschatz verbessert haben.

Dr. Micaela Hesterberg, die bei vielen Problemen schnell mit praktischen Lösungen zur Stelle war.

Juliane Rieker für das Sammeln von Patientenproben und Hilfe bei allen medizinischen Fragen.

Dr. Stephan Meller ebenfalls für das Sammeln der Patientenproben, die gute Zusammenarbeit und die daraus entstandene Freundschaft.

Insbesondere danke ich Petra Franken-Kunkel für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des tierexperimentellen Teils und für ihren Beistand bei allen Höhen und Tiefen während dieser Arbeit.

Außerdem meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Jan Geiersbach, die mir im privaten Bereich die nötige Rückendeckung für das Anfertigen dieser Arbeit gegeben haben.

Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antibody, Antikörper
AKD	Allergische Kontaktdermatitis
BSA	Rinderserum-Albumin, bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CCL	C-Chemokin Ligand
CCR	C-Chemokin Rezeptor
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen, kutanes Lymphozytenantigen
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (s. DNS)
DNAse	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxy-Ribonucleinsäure
DNFB	Dinitrofluorobenzol
DNP	Dinitrophenyl
FACS	Fluorescence activated cell sorter / Fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetal calf serum / fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GM-CSF	Granulocyten-Makrophage-koloniestimulierender Faktor
g	Gramm
GPCR	G-Protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	Human histocompatibility antigen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IKD	Irritative Kontaktdermatitis
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
LC	Langerhans-Zelle
LFA-1	Funktionelles Leukozytenantigen-1 (leukocyte functional antigen 1)
mAb	Monoklonaler Antikörper
MC	Macrophage
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Microliter
ND	Not determined / nicht bestimmt

ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
p	Probability / Wahrscheinlichkeit
PBMC	Peripheal blood mononuclear cell / Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PTX	Pertussistoxin
RNA	Ribonucleic-Acid (s. RNS)
RNAse	Ribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
RPM	Rotations per minute /Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
s	Sekunde
SD	Standard deviation / Standardabweichung
SLS	Natriumlaurylsulfat
TAMRA	5- (und6)-Carboxytetramethylrhodamin
Tc	Cytotoxische T-Zelle
TCR	T-cell receptor / T-Zell Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor necrosis factor / Tumor Nekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	- 8 -
2. Einleitung.....	- 10 -
2.1 Kontaktallergie und Irritation: Epidemiologie und Relevanz.....	- 10 -
2.2 Klinik und Histopathologie der allergischen und irritativen Kontaktdermatitis.....	- 11 -
2.3 Pathogenese kontaktallergischer und irritativer Reaktionen	- 14 -
2.3.1 Allergische Kontaktdermatitis	- 14 -
2.3.1.1 Die Sensibilisierungsphase.....	- 15 -
2.3.1.2 Die Auslösephase	- 16 -
2.3.2 Irritative Kontaktdermatitis	- 18 -
2.4 Chemokine	- 19 -
2.5 Leukozytenwanderung	- 24 -
2.6 Thema der Arbeit	- 25 -
3. Material und Methoden	- 27 -
3.1 Patienten	- 27 -
3.1.2 NiSO ₄ -Patch Test	- 27 -
3.1.3 SLS-Patch Test	- 27 -
3.2 Mausmodelle für allergische und irritative Kontaktdermatitis	- 28 -
3.2.1 Versuchstiere.....	- 28 -
3.2.2 Mausmodell für allergische und irritative Kontaktdermatitis	- 28 -
3.3 Adoptivtransferexperimente.....	- 29 -
3.3.1 Versuchstiere.....	- 29 -
3.3.2 Adoptivtransfer	- 30 -
3.4 Nukleinsäuren-Analyse	- 31 -
3.4.1 Homogenisierung	- 31 -
3.4.2 RNA Extraktion	- 31 -
3.4.3 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung.....	- 32 -
3.4.4 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	- 32 -
3.4.5 Quantitative Real-Time PCR Analyse	- 33 -
3.4.5.1 TaqMan® Probe Nachweismethode	- 34 -
3.4.5.2 SYBR green Nachweismethode	- 35 -
3.5 Immunhistochemie	- 35 -
3.6 Zellkultur	- 36 -
3.6.1 Strukturelle Zellen der Haut.....	- 36 -
3.6.2 DNP-spezifische T-Zellklone	- 37 -
3.6.3 Isolation von T-Zellen	- 38 -
3.7 Chemotaxisexperimente	- 38 -
3.8 Shrunken Centroid Analyse.....	- 40 -
3.9 Statistische Methoden.....	- 41 -
3.10 Geräte	- 41 -
4. Ergebnisse.....	- 42 -
4.1 Analyse der Chemokinexpression in Mausmodellen für Chemikalien- induzierte irritative und allergische Hautentzündungen.....	- 42 -

4.2 Analyse der Chemokinexpression in Chemikalien-induzierten irritativen und allergischen Hautreaktionen beim Menschen.....	- 48 -
4.2.1 Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analyse.....	- 49 -
4.2.2 Immunhistochemische Analyse	- 59 -
4.3 Regulation krankheitsassoziierter Gene.....	- 63 -
4.4 In-vitro-Relevanz krankheitsassoziierter Chemokine	- 65 -
4.6 In-vivo-Relevanz krankheitsassoziierter Chemokine.....	- 71 -
5. Diskussion.....	- 75 -
5.1 Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis zeigen spezifische und distinkte Chemokinexpressionsprofile.....	- 75 -
5.2 Mausmodelle sind auf der molekularen Ebene repräsentativ für allergische und irritative Reaktionen im Menschen.....	- 78 -
5.3 Die CXCR3-Liganden CXCL9/ <i>MIG</i> , CXCL10/ <i>IP-10</i> und CXCL11/ <i>I-TAC</i> sind IFN- γ induzierbare Chemokine.	- 79 -
5.4 CXCL9, CXCL10 und CXCL11 spielen eine wichtige Rolle in Th1-vermittelten Immunreaktionen.....	- 80 -
5.5 IFN- γ produzierende T-Effektorzellen vermitteln die allergische Kontaktdermatitis.....	- 81 -
5.6 Unspezifisch/entzündungsabhängige Chemokine werden primär durch TNF- α /IL-1 β reguliert.....	- 82 -
5.7 Die CXCR3-Liganden kooperieren mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12/ <i>SDF-1α</i> in der Rekrutierung von „memory“ T-Zellen in die Haut.....	- 83 -
5.8 CXCR3-Liganden regulieren die Rekrutierung von Entzündungszellen <i>in-vivo</i>	- 86 -
5.9 Schlussfolgerungen	- 86 -
5.10 Ausblick/Entwicklung.....	- 89 -
6. Literatur.....	- 91 -

1. Zusammenfassung

Die Chemikalien-induzierte allergische (AKD) und irritative (IKD) Kontaktdermatitis zählen in den Industrieländern zu den häufigsten berufsbedingten Dermatosen und sind somit von großer sozioökonomischer Bedeutung.

Kontaktdermatitiden sind T-Zell-vermittelte entzündliche Hauterkrankungen doch die genauen Mechanismen, die pathogenetisch relevante Leukozytenpopulationen an den Entzündungsort rekrutieren sind noch unklar. Zudem ist eine Differenzierung zwischen allergischen und irritativen Hautreaktionen klinisch und histologisch schwierig.

Chemokine sind kleine, zytokinähnliche Moleküle, die das Wanderungsverhalten von Leukozyten kontrollieren und sind damit potente Kandidaten zur Rekrutierung von pathogenetisch relevanten Leukozyten in die Haut. Die Chemokinsuperfamilie ist in ihrer Gesamtheit kloniert und kartiert, was erstmals eine umfassende Analyse der Chemokinexpression in AKD und IKD ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit ist in humanen und murinen Modellen für AKD und IKD das Chemokinexpressionsprofil mittels Quantitativer Real-Time PCR Analysen ermittelt worden. Dabei konnten Allergen/Hapten-spezifisch, unspezifisch/entzündungsabhängig und homöostatisch regulierte Chemokine identifiziert werden. Besonders fielen dabei die Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC) auf. Sie wurden übereinstimmend in den murinen und humanen Modellen in den Hapten-induzierten, allergischen Hautreaktionen exprimiert, nicht aber in den irritativen Hautreaktionen. Dies konnte mit immunhistochemischen Methoden auf Proteinebene bestätigt werden.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Chemokine, die Allergen/Hapten-spezifische von irritativ/unspezifischen Entzündungsreaktionen der Haut zu differenzieren vermögen, wie die CXCR3-Liganden, in zellulären Konstituenten der Haut (Keratinocyten, Fibroblasten, Endothelzellen) primär durch Effektorzytokine (IFN- γ) gebildet wurden, die von T-Zellen nach spezifischen Antigenkontakt produziert wurden. Dagegen wurden Chemokine

(CCL20/*MIP-3 α*), die keine differenzierenden Eigenschaften aufwiesen und in Abhängigkeit von entzündlichen Antworten gebildet wurden, durch die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-1 β reguliert.

Außerdem konnte demonstriert werden, dass die CXCR3-Liganden *in-vitro* und *in-vivo* eine funktionelle Rolle in der Initiierung von allergischen Hautreaktionen übernehmen. In Chemotaxisexperimenten kooperierten die CXCR3-Liganden mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12/*SDF-1 α* in einer synergistischen Art und Weise in der Rekrutierung von CLA+ „skin homing memory“ T-Zellen. Der Synergismus beruhte dabei auf einem Priming-Effekt der CXCR3-Liganden, was in Adoptivtransferexperimenten erstmals auf ein *in-vivo* System übertragen werden konnte.

2. Einleitung

2.1 Kontaktallergie und Irritation: Epidemiologie und Relevanz

Berufsbedingte Dermatosen nehmen seit Jahren an Häufigkeit zu. Sie stehen in den Industrieländern an der Spitze aller Berufskrankheiten. Allergische und irritative Kontaktdermatitiden sind dabei die häufigsten Berufserkrankungen der Haut und betreffen Beschäftigte in vielen unterschiedlichen Berufsgruppen (Yu *et al.*, 2001; Kucenic *et al.*, 2002; HVBG, 2004).

In den USA zählen berufsbedingte Dermatosen zu den häufigsten Krankheitsursachen in der arbeitenden Bevölkerung. Dabei handelt es sich bei 90% der berufsbedingten Dermatosen um eine Kontaktdermatitis (Chew *et al.*, 2003). Die dadurch bis zum Jahre 2001 angefallenen Kosten werden auf 220 Millionen bis 1 Milliarde Dollar geschätzt (Kucenic *et al.*, 2002).

Bereits 1948 entwickelten 7% der weiblichen Bevölkerung in Dänemark eine Nickelallergie, wobei sich die Inzidenz bis 1973 auf 14% verdoppelte (Menne *et al.*, 1982). Bei einer Befragung in der schwedischen Industriestadt Göteborg wurde ermittelt, dass bei den 20- bis 65-jährigen die Jahresprävalenz eines Handekzems 11% betrug. 1385 Personen wurden klinisch untersucht und die irritative Kontaktdermatitis war neben der allergischen Kontaktdermatitis und dem atopischen Handekzem die häufigste Diagnose (Meding *et al.*, 1989).

Auch im asiatischen Raum ist die Kontaktdermatitis von gesundheitspolitischer und ökonomischer Bedeutung. So zählt auch in Taiwan die Kontaktdermatitis zu den häufigsten berufsbedingten Dermatosen (Yu *et al.*, 2001). In Singapur wurden in einer sechs-Jahres-Studie bei 46,6% der untersuchten Arbeiter aus der Bauindustrie eine allergische Kontaktdermatitis diagnostiziert (Wong *et al.*, 1998).

In Deutschland haben beruflich verursachte Hauterkrankungen ebenfalls eine hohe Inzidenz. In der Berufskrankheiten-Dokumentation des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften sind für den Zeitraum von 1999 bis 2003 42295 anerkannte Fälle verzeichnet worden. Es handelt sich dabei überwiegend um Kontaktdermatitiden, die z.B. durch Konservierungs- und Desinfektionsmittel (13,4% der verzeichneten Krankheitsfälle) Nickel bzw. Nickelverbindungen (3,4% der verzeichneten Krankheitsfälle), Latex (5,2%),

Epoxidharze (2,7%), Reinigungsmittel (4,5%) oder Duft- und Parfümstoffe (1,3%) induziert wurden (HVBG, 2004). Zu den risikobehafteten Berufsgruppen zählen vor allem Friseure, Sprechstundenhelfer/innen, Krankenschwestern / -pfleger, Reinigungspersonal, Köche, Maurer, Backwarenhersteller und Zahntechniker. Insbesondere sind Personen betroffen, die viel im feuchten Milieu arbeiten und mit Reinigungs- und Desinfektionsmittel in Kontakt kommen (Dickel *et al.*, 2002; Kucenic *et al.*, 2002; Berufskrankheiten-Dokumentation, 2004; HVBG, 2004).

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass vor allem junge Frauen häufiger betroffen sind als Männer (Meding *et al.*, 1989; Meding, 2000). Handekzeme wurden deswegen bis 1990 in den USA sogar zum Teil als „housewife’s dermatitis“ bezeichnet (Meding, 2000). Die höhere Prävalenz von Kontaktdermatitiden in der weiblichen Bevölkerung liegt darin begründet, dass die Berufe, in denen es vermehrt zum Kontakt mit Risikostoffen kommt, zu den Berufen zählen, die häufiger von Frauen ausgeübt werden (Friseurin, Reinigungskraft, Pflegeberufe, etc.). Auch im privaten Bereich haben Frauen durch das Tragen von Schmuck, vor allem Ohrringen und das Benutzen von Cremes und Parfümstoffen häufigeren Kontakt zu Stoffen, die Kontaktekzeme hervorrufen können. So treten schon bei Schulmädchen gehäuft, durch das Durchstechen von Ohrringen induziert, Kontaktallergien gegen Nickel auf (Larsson-Stymne *et al.*, 1985).

2.2 Klinik und Histopathologie der allergischen und irritativen Kontaktdermatitis.

Die Kontaktdermatitis ist entweder irritativ (toxisch) oder allergisch bedingt und kann akut oder chronisch verlaufen.

„Die akute toxische Kontaktdermatitis entwickelt sich als eine akute entzündliche Reaktion nach äußerem Kontakt mit primär obligat-toxischen, die Haut schädigenden Noxen bei normaler Hautempfindlichkeit“ (Braun-Falco *et al.*, 1996). Das bedeutet durch die einmalige Einwirkung von irritativ hautschädigenden Stoffen kann eine akute irritative Kontaktdermatitis ausgelöst werden. Wiederholt sich die Einwirkung schwach hautirritierender Stoffe, in

primär nicht schädigenden Konzentrationen, über einen längeren Zeitraum, kann sich ein chronisches irritatives Kontaktekzem entwickeln (Braun-Falco *et al.*, 1996; Vetter, 1998).

„Akuter allergischer Kontaktdermatitis und chronischem allergischem Kontaktekzem liegt eine zellvermittelte Allergie vom Spättyp (Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell) mit einer speziellen Beteiligung der Epidermis (Allergie vom Ekzemtyp) zugrunde“ (Braun-Falco *et al.*, 1996). Zur Ausbildung einer allergischen Antwort, muss sich der Patient zuvor durch früheren Kontakt mit der auslösenden Substanz (Kontaktallergen) sensibilisieren. Dies geschieht durch die Aufnahme des Kontaktallergens durch die Haut und die spätere Proliferation allergenspezifischer T-Zellen in den Lymphknoten. Die akute allergische Kontaktdermatitis ist meist von begrenzter Dauer, denn die Hautreaktionen heilen nach Allergenkarenz ab. Das chronische allergische Kontaktekzem bildet sich bei fortgesetztem Allergenkontakt. Häufig werden die verursachenden Kontaktallergene entweder nicht erkannt, wodurch der Allergenkontakt aufrechterhalten wird, oder sind schwer zu vermeiden (wie z.B. ubiquitär vorkommendes Nickel).

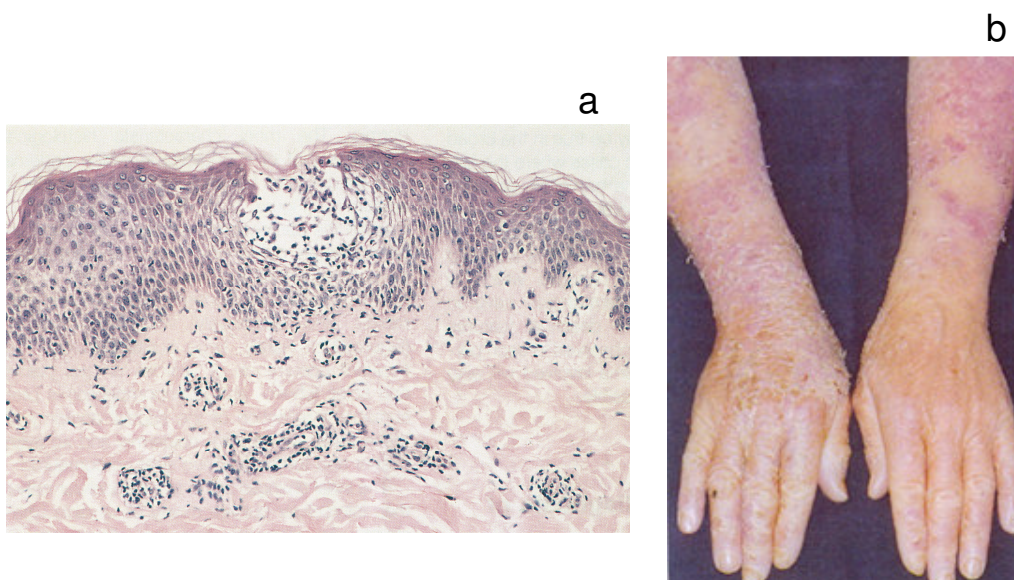


Abbildung 2.1: Histologisches und klinisches Bild des Kontaktekzems. a, Spongiose und Blasenbildung in einem Kontaktekzem. H&E-Färbung x 286. b, klinisches Bild eines chronischen Kontaktekzems.

Irritative und allergische Kontaktdermatitis sind klinisch kaum zu unterscheiden. Das klinische Bild ist vor allem durch pathologische Veränderungen in der Epidermis und im Korium geprägt. Der akute Verlauf ist durch exsudativ-entzündliche Vorgänge mit Rötungen, Schwellungen, Bläschen, Exsudation und Krustenbildung gekennzeichnet, der chronische Verlauf (Kontaktekzem) durch proliferativ-entzündliche Vorgänge mit Rötung, Hautverdickung infolge zellulärer Infiltration, Epidermisverdickung (Akanthose) und vermehrter, gestörter Hornschichtbildung (Hyperparakeratose) (Braun-Falco *et al.*, 1996). Ungefähr 90 bis 95 % der an einer allergischen oder irritativen Kontaktdermatitis leidenden Betroffenen bilden ein chronisches Kontaktekzem aus, wobei zumeist die Hände befallen sind (Vetter, 1998; Meding, 2000) (Abbildung 2.1 b). Die chronischen Handekzeme sind entweder hyperkeratotisch-rhagardiform oder dyshydrosiform. Das hyperkeratotisch-rhagardiforme Ekzem ist eine trockene Ekzemform mit scharf begrenzten, gering entzündlich geröteten Herden, die eine verdickte, schwielenartige Hornschicht mit tiefen Rhagarden aufweisen. Das dyshydrosiforme Ekzem ist vor allem durch die Bildung von Bläschen gekennzeichnet. Daneben treten aber auch entzündliche Rötungen, Krusten und Schuppen in Erscheinung (Braun-Falco *et al.*, 1996).

Auch das histologische Erscheinungsbild allergischer und irritativer Kontaktdermatitiden ist sehr ähnlich und überwiegend durch die Bildung von interzellulären Ödemen (Spongiosen) geprägt (Abbildung 2.1 a) (Marks, 1992). Teilweise kommt es, bei starker Anreicherung von Ödemflüssigkeit, zur Zerstörung der desmosomalen Verbindungen der Epidermiszellen und es bilden sich spongiotische Bläschen (Marks, 1992). Platzen diese Bläschen, entlassen sie ihren serösen Inhalt und trocknen zu Krusten. Bei chronischen Kontaktekzemen kommt es durch wiederholte Entzündungsschübe zu regenerativen Phänomenen (Akanthose, Hyperparakeratose) (Braun-Falco *et al.*, 1996). Das entzündliche Infiltrat besteht vorwiegend aus T-Lymphozyten (Gawkrodger *et al.*, 1986; Willis *et al.*, 1986). Daneben finden sich aber auch Makrophagen, Mastzellen und vereinzelt neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten (Dvorak *et al.*, 1976; Gawkrodger *et al.*, 1986; Braun-Falco *et al.*, 1996).

Aufgrund der bestehenden Ähnlichkeit in ihrem klinischen und histologischen Erscheinungsbild, ist in der heutigen Diagnostik eine Unterscheidung zwischen

allergischen und irritativen Kontaktdermatitiden schwierig. Selbst moderne immunhistochemische Methoden lassen eine Differenzierung zwischen den beiden Dermatitisformen nicht zu (Braun-Falco *et al.*, 1996).

2.3 Pathogenese kontaktallergischer und irritativer Reaktionen

Die allergische und die irritative Kontaktdermatitis zeigen zwar klinisch und histologisch keine Unterschiede, doch die ihnen zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen werden als fundamental unterschiedlich angenommen. Im Verlauf der allergischen Kontaktdermatitis kommt es zur Bildung von Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen, die eine allergische Hautreaktion induzieren. Dagegen verläuft die irritative Kontaktdermatitis unabhängig von Antigenpräsentation durch die direkte Induktion von proinflammatorischen Mediatoren, die eine direkte Rekrutierung von Leukozyten in die Haut verursachen.

2.3.1 Allergische Kontaktermatitis

Die allergische Kontaktdermatitis (AKD) ist eine T-Zell-vermittelte entzündliche Reaktion der Haut auf wiederholten Allergenkontakt in sensibilisierten Individuen (Engeman *et al.*, 2000).

Die Pathophysiologie der AKD besteht aus zwei Phasen: 1. einer Sensibilisierungsphase, auch als Induktionsphase oder afferente Phase bezeichnet und 2. einer Auslösephase, die auch als efferente Phase bezeichnet wird. In der Sensibilisierungsphase werden naive T-Zellen aktiviert und differenzieren zu Allergen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen („memory“ T-Zellen). In der Auslösephase führt erneuter Allergenkontakt zur Aktivierung der „memory“ T-Zellen und zur Proliferation von Allergen-spezifischen Effektor-T-Zellen, die an den Ort der Allergendisposition rekrutiert werden und dort eine entzündliche Hautreaktion hervorrufen.

2.3.1.1 Die Sensibilisierungsphase

Die meisten Kontaktallergene sind Haptene, kleine Moleküle mit geringem Molekulargewicht, die für sich keine immunogene Wirkung besitzen. Sie müssen erst nach Eindringen in die Haut an körpereigene, lösliche oder zellgebundene Proteine binden und mit diesen einen Hapten-Protein-Komplex bilden, der als Antigen fungiert (Saint-Mezard *et al.*, 2004)

Haptene stammen häufig von instabilen Chemikalien, den so genannten Prohaptenen, die erst noch in der Epidermis zu Haptenen metabolisiert werden müssen, um an körpereigene Proteine binden zu können (z.B. Urushiol, einige Metallsalze oder polyaromatisches Hydrocarbon) (Dupuis, 1979; Saloga *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1995; Saint-Mezard *et al.*, 2004).

Der Hapten-Protein-Komplex wird von antigenpräsentierenden Zellen, den epidermalen Langerhanszellen oder den dermalen dendritischen Zellen, aufgenommen (Riemann *et al.*, 2003). Die antigenpräsentierenden Zellen wandern aus der Haut zu den drainierenden Lymphknoten (Abbildung 2.2), wobei sie den Hapten-Protein-Komplex prozessieren und ihn an den „major histocompatibility complex“ (MHC)-Klasse I oder -Klasse II gebunden auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Dabei gehen die Langerhanszellen von einem ruhenden Zustand in einen aktivierten Zustand über, was durch mehrere Faktoren bedingt wird (Riemann *et al.*, 2003). Unter anderem sind proinflammatorische Mediatoren, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) maßgeblich daran beteiligt (Grabbe *et al.*, 1998). Einmal wirkt der Haptenkontakt selbst auf Langerhanszellen, indem er die Sezernierung von IL-1 β induziert. Zum anderen verursacht die Interaktion des Haptens mit den umliegenden Keratinozyten, dass diese ebenfalls proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , GM-CSF) produzieren. TNF- α und IL-1 β stimulieren wiederum die Keratinozyten zur Expression von Adhäsionsmolekülen, was die Migration der Langerhanszellen durch die extrazelluläre Matrix ermöglicht (Saint-Mezard *et al.*, 2004). In den drainierenden Lymphknoten angekommen präsentieren die Langerhanszellen den Hapten-Protein-MHC-Komplex naiven T-Zellen, welche zu Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen differenzieren und proliferieren (Riemann *et al.*, 2003). Gleichzeitig führen bislang noch unklare Mechanismen in der

Sensibilisierungsphase zur Rekrutierung von Entzündungszellen, vorwiegend T-Zellen, an den Ort der Allergenexposition. So kann bereits beim ersten Allergenkontakt, abhängig von der Stärke der Exposition, eine unspezifische Entzündungsreaktion stattfinden.

2.3.1.2 Die Auslösephase

In einem sensibilisierten Organismus genügen geringe Mengen des betreffenden Kontaktallergens, um eine allergische Kontaktreaktion auszulösen, die 24 - 48 Stunden nach Allergenkontakt ihr Maximum erreicht.

Das erneut in die Haut eindringende Hapten wirkt zunächst direkt auf die epidermalen Zellen und führt nach Allergenkontakt zur Freisetzung von primären proinflammatorischen Mediatoren (TNF- α , IL-1 β) und Chemokinen aus den Keratinozyten, zur Aktivierung von Endothelzellen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies trägt dazu bei, dass bereits in den ersten Stunden nach Allergenkontakt eine unspezifische Immunantwort erfolgt und eine erste Welle von Entzündungszellen an den Ort der Haptenexposition rekrutiert wird. Dabei gelangen auch, die in der Blutbahn zirkulierenden Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen in Hapten-exponierte Gewebe (Riemann *et al.*, 2003). Hier wird ihnen von ortsansässigen Zellen, z.B. Langerhanszellen oder anderen MHC-Molekül-exprimierenden Zellen, wie Keratinozyten oder dermalen dendritischen Zellen, das Antigen präsentiert (Saint-Mezard *et al.*, 2004). Die dadurch aktivierten Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren, insbesondere Interferon- γ (IFN- γ). Durch Mechanismen, die bis heute noch unklar sind, werden immer mehr Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen zum Entzündungsort rekrutiert, was schließlich einen inflammatorischen Prozess in Gang setzt, der zur Akkumulation eines entzündlichen Infiltrates (T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) am Orte des Allergenkontaktes führt (Abbildung 2.2) (Grabbe *et al.*, 1998). Klinisch wird hier eine Kontaktdermatitis sichtbar.

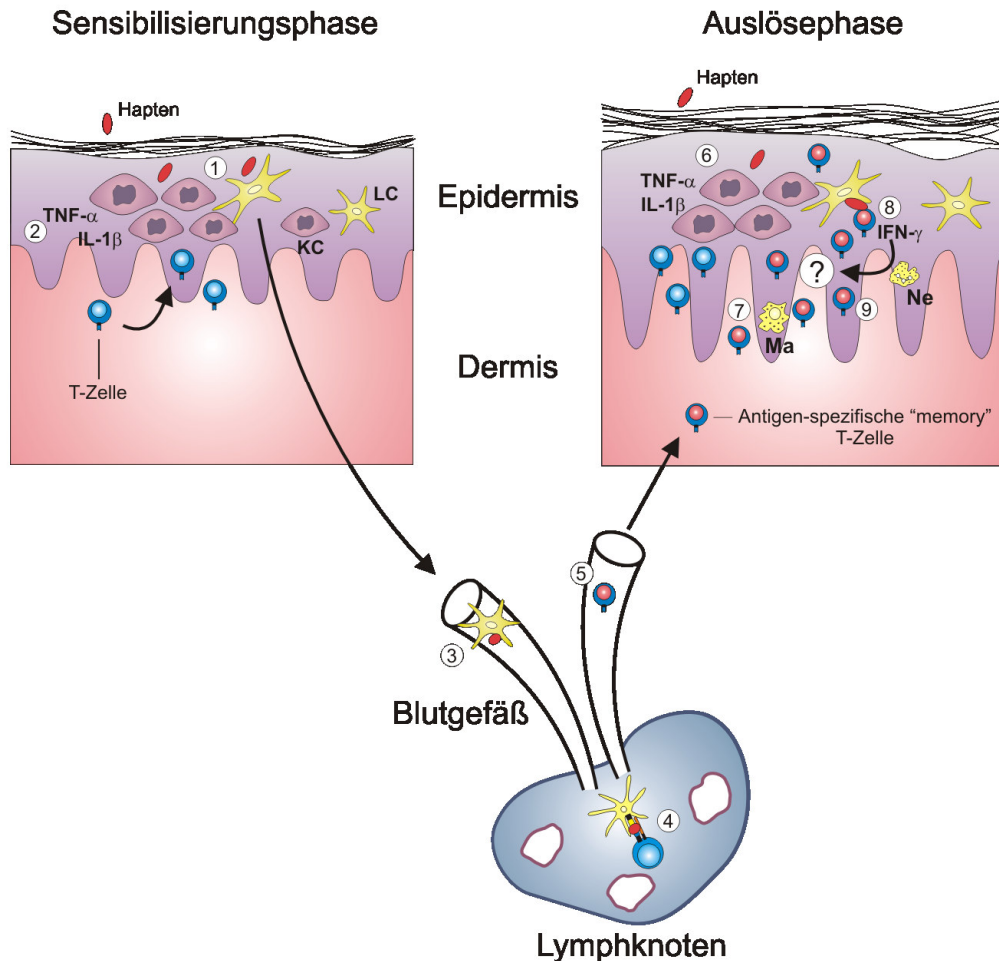


Abbildung 2.2 Der Pathomechanismus der AKD. 1. *Sensibilisierungsphase:* Das Hapten bildet nach Eindringen in die Haut einen Hapten-Protein-Komplex, der von Langerhanszellen (LC) aufgenommen wird (1), gleichzeitig produzieren Keratinozyten (KC) nach Haptenkontakt proinflammatorische Mediatoren (TNF- α , IL-1 β) (2). Die LCs wandern durch die Blutbahn zu den Lymphknoten (3) und präsentieren dort das Allergen naiven T-Zellen, welche zu Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen differenzieren (4). 2. *Auslösephase:* Bei erneutem Allergenkontakt setzen die KCs primäre proinflammatorische Mediatoren frei (6). Entzündungszellen werden rekrutiert, wobei auch Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen aus der Blutbahn in das allergenexponierte Gewebe gelangen (7). Diese sezernieren nach Kontakt mit antigenpräsentierenden LCs proinflammatorische Zytokine (IFN- γ) (8). Schließlich kommt es zur Akkumulation von infiltrierenden Zellen (T-Zellen, Markophagen (Ma), Neutrophile (Ne)).

2.3.2 Irritative Kontaktdermatitis

Die Ausbildung einer klinisch sichtbaren irritativen Kontaktdermatitis (IKD) wird durch eine unspezifische immunologische Antwort induziert.

Es gibt viele unterschiedliche Irritantien, wie z.B. organische Lösungsmittel, Detergentien, Oxidations- oder Reduktionsmittel. Aufgrund ihrer Heterogenität schädigen sie die Haut durch unterschiedliche Mechanismen. Es kann zur direkten Zerstörung von Gewebe kommen (Corsini *et al.*, 1998), organische Lösungsmittel führen häufig zu Veränderungen an Gefäßen (Thrombenbildung, Vasodilatation) und viele Detergentien stören die natürliche Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut, was zur Austrocknung der Epidermis führt (Loffler *et al.*, 2000).

Während der kontaktirritativen Reaktion kommt es zur Freisetzung von primären, proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-1 α (Hunziker *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1994), vor allem aus den Keratinozyten (Abbildung 2.3) (Corsini *et al.*, 1998). Die Epidermis besteht zu 95% aus Keratinozyten, welche somit das „Hauptangriffsziel“ für Irritantien darstellen (McKenzie *et al.*, 1990). TNF- α wird häufig die Rolle des Hauptmediators von irritativen Reaktionen zugeschrieben (Berardesca, 1997). Es aktiviert Makrophagen und induziert die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches an der Leukozytenmigration beteiligt ist, auf Keratinozyten und Endothelzellen (Berardesca, 1997; Loffler *et al.*, 2000). Zusammengenommen tragen diese Faktoren zur Rekrutierung eines zellulären Infiltrates bei, welches überwiegend aus T-Zellen, aber auch aus Makrophagen und Neutrophilen besteht. Die genauen Mechanismen, die der Rekrutierung von Entzündungszellen zugrunde liegen sind allerdings zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Schließlich kommt es zur Ausbildung einer irritativen Hautreaktion an dem Irritant-exponierten Hautareal.

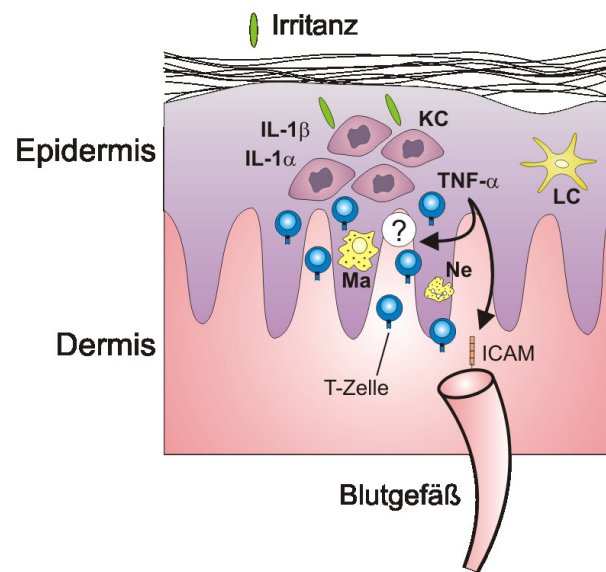


Abbildung 2.3 Der Pathomechanismus der IKD. Durch Kontakt mit Irritantien sezernieren Keratinozyten (KC) primäre, proinflammatorische Mediatoren (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α). Es kommt zur Rekrutierung eines unspezifischen Infiltrates, bestehend aus T-Zellen, Makrophagen (Ma) und Neutrophile (Ne). Die Bildung von Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen bleibt aus.

2.4 Chemokine

Chemokine sind kleine, 8-12 kDa große, zytokinähnliche Moleküle, die in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert sind. Chemokine haben in ihrer Aminosäuresequenz charakteristischerweise vier Cysteine. Die einzige Ausnahme ist das Chemokin XCL1/*Lymphotactin*, welche nur zwei Cysteinereste aufweist.

Die Entdeckung und Beschreibung neuer Chemokine ging in ihrer Anfangsphase sehr schnell voran, so dass dasselbe Chemokin von unterschiedlichen Gruppen unter verschiedenen Namen veröffentlicht wurde. Um für die in diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftler Klarheit zu schaffen, wurde 1999 auf dem Chemokin Symposium in Keystone eine systematische Nomenklatur eingeführt. Die Chemokine wurden je nach Lage der ersten beiden

N-terminalen Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz in vier Unterfamilien eingeteilt. Man unterscheidet heute die CC-Chemokine, bei denen die ersten beiden Cysteine direkt nebeneinander liegen, die CXC-Chemokine, bei denen die ersten beiden Cysteine durch ein Nicht-Cystein getrennt sind, die C-Chemokine, zu denen das oben erwähnte XCL1/*Lymphotactin* gehört und die CX₃C-Chemokine, bei denen drei Nicht-Cysteine zwischen den N-terminalen Cysteinen liegen (Abbildung 2.4).

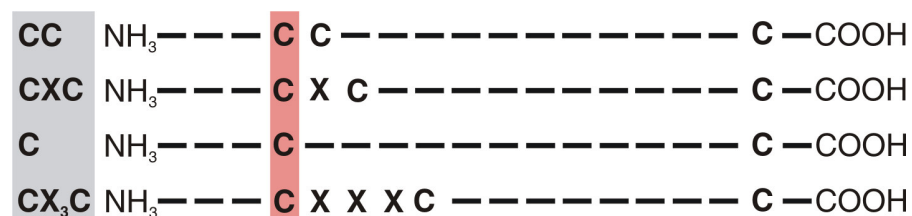


Abbildung 2.4 Die Struktur der Chemokinunterfamilien. Entsprechend der Abfolge der ersten beiden Cysteine in der Aminosäuresequenz unterscheidet man die CXC-, CC-, C- und CX₃C- Chemokinfamilien.

Analog zu den Chemokinrezeptoren werden nun auch die Liganden nach ihrem systematischen Familiennamen, gefolgt von L für Ligand und einer Nummer benannt. Zurzeit sind 45 humane Chemokinliganden bekannt. Neben den in Tabelle 2.1 zusammengefasst dargestellten Chemokinen sind mittlerweile CCL3-L1 und CCL4-L1, Isoformen von CCL3 und CCL4, identifiziert worden (Townson *et al.*, 2002). Die meisten bekannten murinen Chemokinliganden sind homolog zu den humanen und werden, wie ebenfalls in Tabelle 2.1 dargestellt, mit denselben systematischen Namen bezeichnet (Zlotnik *et al.*, 2000). Es existieren aber auch murine Chemokinliganden für die kein entsprechendes humanes Gegenüber bekannt ist, wie z.B. CCL6/*C10*, CCL9/*MIP-1 γ* und CCL12/*MCP-5*. Umgekehrt gibt es aber auch humane Chemokinliganden ohne zugehörigen, homologen murinen Liganden (z.B. CCL18/*DC-CK1*) (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Systematische Nomenklatur für Chemokine (Keystone Chemokin Symposium 1999)

CC Chemokin / Rezeptor Familie			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptoren</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	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>Chemokinrezeptoren</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			
<i>Systematischer Name</i>	<i>Humaner Ligand</i>	<i>Muriner Ligand</i>	<i>Chemokinrezeptor</i>
CX3CL1	Fractalkine, neurotactin	Fractalkine	CX3CR1

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die sieben transmembrane Domänen aufweisen. Zur Zeit sind 18 humane Chemokinrezeptoren bekannt, die je nachdem, welche Chemokinunterfamilie sie binden, als CC-, CXC-, XC- oder CX3C-Rezeptoren bezeichnet werden (Tabelle 2.1) (Rossi *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000).

Die Chemokinrezeptoren verwenden unterschiedliche Signaltransduktionswege (Homey, 2003), wodurch Chemokine viele verschiedene biologische Funktionen vermitteln können, wie z.B. Zellrekutierung, gerichtete Leukozytenwanderung, Entzündungen, Angiogenese, Metastasierung, Wundheilung (Abbildung 2.5) (Rossi *et al.*, 2000) .

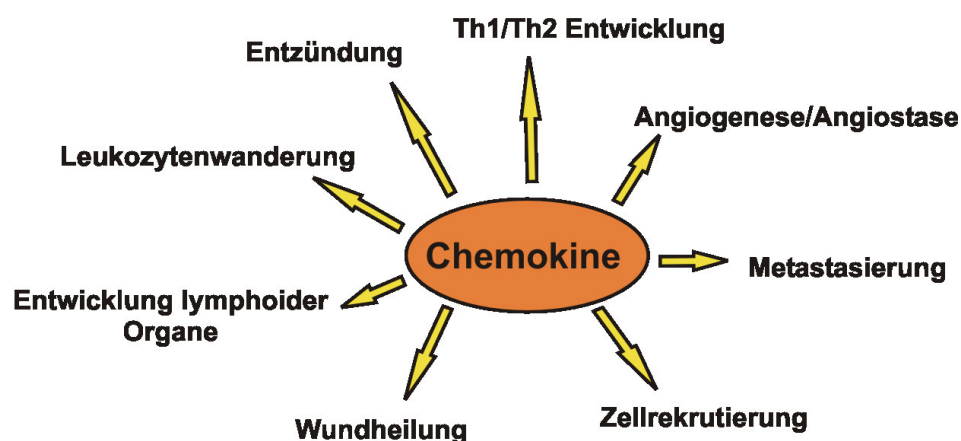


Abbildung 2.5 Die biologischen Funktionen von Chemokinen. Chemokine vermitteln viele verschiedene biologische Funktionen. (verändert nach Rossi 2000).

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen, die Chemokine vermitteln können ist es möglich, homöostatische von inflammatorischen Chemokinen zu unterscheiden. Viele Chemokine zeigen ein stark an einen entzündlichen Prozeß gebundenes Expressionsmuster. Sie werden meist von Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten exprimiert und sind häufig durch Th1-assoziierte Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-12), durch Th2-assoziierte Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) oder durch primäre proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β) induzierbar (Rossi *et al.*, 2000). Humane Epithelzellen produzieren z.B. nach Stimulation mit TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ CCL11/*Eotaxin* (Lilly *et al.*, 1997). Fibroblasten sezernieren nach IL-4 und/oder TNF- α Stimulation CCL11/*Eotaxin* und CCL5/*RANTES* (Mochizuki *et al.*, 1998; Teran *et al.*, 1999) und IL-4 und IL-13 induzieren *in vitro* die Produktion von CCL2/*MCP-1* in aus der Lunge stammenden Fibroblasten (Doucet *et al.*, 1998). Während die Identifikation von Chemokinen, die durch Th1- oder Th2-assoziierte Zytokine induziert werden, noch in den Anfängen steckt, so ist mittlerweile gut charakterisiert, dass verschiedene Chemokinrezeptoren primär auf Th1-Lymphozyten exprimiert werden (CXCR3 und CCR5), wohingegen andere Chemokinrezeptoren primär auf Lymphozyten vom Th2 Phänotyp ausgeprägt werden (CCR3, CCR4 und CCR8) (Homey *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000).

Neben den inflammatorischen Chemokinen gibt es verschiedene Chemokine, die in gesunden Geweben oder Organen ohne die Präsenz von inflammatorischen Stimuli exprimiert werden und denen homöostatische Funktionen zukommen. Dazu zählt z.B. CCL25/*TECK*, welches z.B. im Thymus exprimiert wird und organspezifische Funktionen, wie die Regulierung der T-Zell-Entwicklung, erfüllt (Kim *et al.*, 1998) oder im Darm das „homing“ von T-Lymphozyten in den Dünndarm regelt (Hosoe *et al.*, 2004). CXCL12/*SDF-1 α* wird konstitutiv von stromalen Zellen im Knochenmark produziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Reifung von B-Zellen (D'Apuzzo *et al.*, 1997; Bleul *et al.*, 1998). Das von epidermalen Keratinozyten gebildete CCL27/*CTACK* zählt ebenfalls zu den homöostatischen Chemokinen. Von Homey *et al.* konnte gezeigt werden, dass CCL27 durch Stimulation von Keratinozyten mit TNF- α und IL1- β induziert wird und die Rekrutierung von

„memory“ T-Zellen in die Haut reguliert und somit eine bedeutende Rolle bei der Initiierung von Allergen-spezifischen Hauterkrankungen spielt (Homey *et al.*, 2002). Somit können also auch die in bestimmten Geweben und Organen konstitutiv exprimierten, homöostatischen Chemokine an der Ausbildung von Entzündungsprozessen beteiligt sein.

2.5 Leukozytenwanderung

Hautinfiltrierende T-Zellen haben eine Schlüsselrolle bei der Initiierung von inflammatorischen Hauterkrankungen, wie der allergischen oder irritativen Kontaktdermatitis. Dadurch bekommt die Fähigkeit von Chemokinen pathogenetisch relevante Leukozytenpopulationen in periphere Organe (Haut) zu rekrutieren im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Bedeutung und soll nachfolgend näher erläutert werden.

Wie bereits in 2.2 beschrieben, werden bei der Ausbildung einer kontaktallergischen oder irritativen Immunantwort T-Zellen durch spezifische bzw. unspezifische Stimuli aktiviert und in die betroffenen Hautareale rekrutiert. Zunächst treiben die T-Zellen im Blutgefäßsystem (Schweben) und interagieren dann mit Zelloberflächenmolekülen, den sogenannten Selektinen. Selektine sind membranständige Glykoproteine, die auf aktiviertem Gefäßendothel exprimiert werden (Abbildung 2.6) (Janeway *et al.*, 2002). Die T-Zellen bilden schwache Bindungen mit den Selektinen, die allerdings dem Blutstrom nicht standhalten können, so dass die T-Zellen am Endothel entlangrollen, indem sie immer wieder neue Bindungen herstellen und alte lösen (rollende Adhäsion). Die Bindung von Chemokinen an die Leukozyten induziert bei den auf der Leukozytenoberfläche ausgeprägten Leukozytenintegrinen (LFA-1) eine Konformationsänderung. Dadurch gehen die Leukozytenintegrine mit interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) auf dem Endothel eine feste Bindung ein, wodurch die Bewegung der T-Zellen gestoppt wird (Janeway *et al.*, 2002). Die T-Zellen können sich nun zwischen den Endothelzellen hindurchzwängen (Diapedese) und gelangen aus der Blutbahn in das periphere Gewebe. Matrix-gebundene Chemokine, die von Zellen am Infektionsort sezerniert werden, bilden hier einen Gradienten, dem die Leukozyten folgen (Migration) (Butcher *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000).

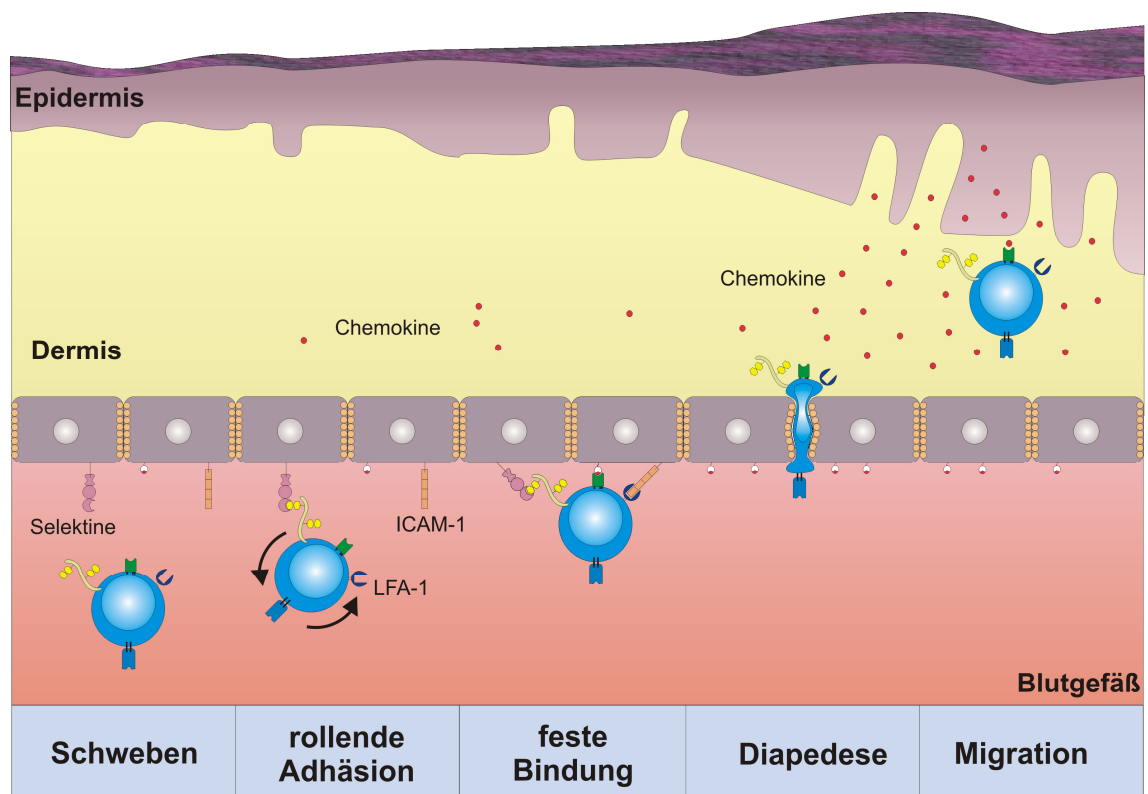


Abbildung 2.6 Leukozytenwanderung. Aktivierte Leukozyten schweben zuerst im Blutgefäßsystem, rollen anschließend aufgrund der Interaktion von Selektinen entlang des Gefäßendothels. Durch Stimulation mit Chemokinen werden Leukozytenintegrine (LFA-1) auf der Leukozytenoberfläche aktiviert und die dadurch ermöglichte Bindung an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) auf dem Endothel stoppt das Rollen. Die Leukozyten gehen eine feste Bindung an das Endothel ein und können nun durch das Gefäßendothel in das periphere Gewebe gelangen (Diapedese) und zum Entzündungsort migrieren.

2.6 Thema der Arbeit

Die Ausbildung einer irritativen oder allergischen Kontaktdermatitis wird vor allem durch T-Zellen vermittelt (Willis *et al.*, 1986; Engeman *et al.*, 2000). Die genauen Mechanismen, die der Rekrutierung von pathogenetisch relevanten Leukozytenpopulationen in die Haut zugrunde liegen, sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Chemokine tragen zur Steuerung der Leukozytenwanderung bei (siehe 2.5) und deshalb liegt nahe, dass sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese von irritativen und allergischen Hautreaktionen übernehmen. Da die klinische und histologische Differenzierung von allergischen und irritativen Kontaktdermatitiden schwierig ist (siehe 2.2), stellt sich die Frage, ob Unterschiede zwischen allergischer und irritativer Kontaktdermatitis bezüglich ihrer Chemokinexpression bestehen.

Durch die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms und die Erstellung von „Expressed Sequence Tags“ (EST)-Datenbanken und die Entwicklung neuer molekularbiologischer und bioinformatischer Methoden, wurde es in den letzten Jahren möglich, die Chemokinsuperfamilie als eine der ersten Proteinsuperfamilien vollständig zu klonieren und zu kartieren. Damit besteht zum ersten Mal die Möglichkeit einer umfassenden Untersuchung der Chemokinexpression in Chemikalien-induzierter allergischer und irritativer Kontaktdermatitis.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren in der Pathogenese Chemikalien-induzierter allergischer und irritativer Hauterkrankungen zu klären. Dabei sollen folgende Fragen adressiert werden:

- Zeigen Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis distinkte Chemokinexpressionsprofile?
- Existieren Unterschiede zwischen allergischen und irritativen Hautreaktionen in ihrer Chemokinexpression?
- Sind Mausmodelle auf der molekularen Ebene repräsentativ für allergische und irritative Reaktionen im Menschen?
- Spielen krankheitsassoziierte Chemokine eine funktionale Rolle bei der Initiierung Chemikalien-induzierter allergischer und irritativer Hauterkrankungen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde in dieser Arbeit eine umfassende Analyse der Chemokinexpression in humanen und murinen Modellen für irritative und allergische Hautreaktionen durchgeführt und krankheitsassoziierte Chemokine identifiziert. Zusätzlich wurde die Regulation dieser krankheitsassoziierten Chemokine untersucht und deren *in-vitro*- und *in-vivo*-Relevanz überprüft.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Die für diese Arbeit verwendeten Hautbiopsien wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten entnommen. Die Durchführung der NiSO₄-Patch Tests und der SLS-Patch Tests und die Entnahme der Hautproben erfolgte am finnischen Institut für berufliche Gesundheit (Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki) mit der Zustimmung der zuständigen lokalen Ethikkommission (Ethics Committee of Department of Medicine, Helsinki-Uusimaa Hospital District, Finland). Die Hautproben wurden von Dr. Antti Lauerma für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.1.2 NiSO₄-Patch Test

Als humanes Modell für die Chemikalien-induzierte allergische Kontaktdermatitis wurde an freiwilligen Probanden ein NiSO₄-Patch Test durchgeführt. Dazu wurden 5% NiSO₄ in Petrolatum (Epikon Ltd, Espoo, Finnland) in kleinen Finn-Kammern (Epitest, Hyrylä, Finnland) auf den Rücken der Probanden aufgetragen.

Nach einer Expositionszeit von 2, 6 und 48 Stunden wurden aus den drei Test-Arealen, sowie aus gesund wirkender Rückenhaut eine 6 mm Stanzbiopsie entnommen. Die Biopsien wurden zweigeteilt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung nach Düsseldorf geschickt. Die eine Hälfte der Hautproben wurde für Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen und die andere Hälfte für immunhistochemische Analysen verwendet.

3.1.3 SLS-Patch Test

Als Modell für die Chemikalien-induzierte irritative Kontaktdermatitis wurde ein Sodiumlaurylsulfat-(SLS)-Patch Test, ebenfalls an freiwilligen Probanden durchgeführt. Dazu wurde 1% SLS (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Wasser in großen Finn-Kammern (Epitest, Hyrylä, Finnland) auf nicht-lesionale Rückenhaut von NiSO₄-sensibilisierten Patienten gegeben. Analog zum NiSO₄-Patch Test wurden nach einer Expositionszeit von 2, 6 und 48 Stunden 6 mm

Biopsien aus den drei Test-Arealen, sowie aus gesunder Rückenhaut ausgestanzt. Die Biopsien wurden zweigeteilt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung nach Düsseldorf geschickt. Die eine Hälfte der Hautproben wurde für Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen und die andere Hälfte für immunhistochemische Analysen verwendet.

3.2 Mausmodelle für allergische und irritative Kontaktdermatitis

3.2.1 Versuchstiere

Es wurden 8-12 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse (Taconic, Germantown, USA) verwendet. Die Haltung der Tiere entsprach den Standardanforderungen (siehe unter 3.3.1).

3.2.2 Mausmodell für allergische und irritative Kontaktdermatitis

Zur Auslösung einer Chemikalien-induzierten allergischen Hautreaktion wurden BALB/c Mäuse am Bauch rasiert und einen Tag später mit 100 µl 0,5% (irritativen Dosis) des Haptens Dinitrofluorobenzol (DNFB, Sigma, Seelze, Deutschland) an der rasierten Stelle sensibilisiert. 6 Tage später wurde eine allergische Zweitantwort ausgelöst, indem die dorsalen und die ventralen Seiten der Ohren mit je 12,5 µl 0,2 % DNFB benetzt wurden. Das DNFB wurde in DAE433 (Vehikel), bestehend aus 40% Dimethylacetamid (Sigma), 30% Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 30% Ethanol (Merck), gelöst. Als Kontrollen wurden Mäuse entweder nur mit 0,5% DNFB oder mit DAE433 an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden erfolgte die Messung der Ohrschwellung mit einem Oditest-Mikrometer (Kröplin, Schlüchtern, Deutschland). Direkt im Anschluss wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet, die Ohren abpräpariert und die epidermale Schicht von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt und für die RNA Extraktion und Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen verwendet.

Zur Auslösung einer Chemikalien-induzierten irritativen Hautreaktion wurden BALB/c Mäuse mit dem Standardirritanz Crotonöl (Sigma, Seelze, Deutschland)

behandelt. Dazu wurden je 12,5 µl auf die dorsalen und ventralen Seiten der Ohren pipettiert. Die Messung der Ohrschwellung und das Töten der Tiere erfolgte in derselben Art und Weise, wie bei den DNFB-behandelten Tieren nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden.

Die Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen der Chemokinexpression wurden nach dem unter 3.4 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Für einen Teil der untersuchten Chemokine sind mir die Rohdaten von den Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen von Herrn Prof. Dr. Homey zur Verfügung gestellt worden. Für die Untersuchung der restlichen im Ergebnisteil aufgeführten Chemokine ist mir die aus den Epidermisproben generierte cDNA zur Durchführung der Quantitativen Real-Time (RT)-PCR von Herrn Prof. Dr. Homey bereitgestellt worden.

3.3 Adoptivtransferexperimente

3.3.1 Versuchstiere

Es wurden 8-12 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse (Taconic, Lille Skensved, Dänemark) verwendet. Nach der Lieferung wurden die Tiere vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche in der neuen Umgebung akklimatisiert. Die Tierhaltung wurde von der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf übernommen und entsprach den vom Tierschutzgesetz vorgegebenen Richtlinien. Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit) mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus (6^{00} bis 18^{00} Uhr Beleuchtung, 320 LUX) untergebracht und in Käfigen ($800\text{ cm}^2 \times 15\text{ cm}$) in Gruppen von 3-6 Tieren gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter (SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) und zu Trinkwasser (ozonisiert und angesäuert mit HCL, pH 2,6 – 3,0).

3.3.2 Adoptivtransfer

BALB/c Mäuse wurden am Tag 0 mit 0,5% Dinitrofluorobenzol (DNFB, Sigma, Seelze, Deutschland) sensibilisiert. Das DNFB wurde in DAE433 (Vehikel), bestehend aus 40% Dimethylacetamid (Sigma), 30% Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 30% Ethanol (Merck), gelöst. Am Tag 6-10 wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die Milz, sowie die aurikulären Lymphknoten entnommen. Die Lymphknoten der Tiere wurden zusammen mit RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) in eine Kammer einer 24-Well-Platte (Costar, Cambridge, USA) gegeben und mit einer breiten Pinzette zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension über einen 70 µm Filter (Cell Strainer, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) in ein Reaktionsgefäß (Falcon, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) gefiltert. Die Milzen der Tiere wurden zusammengefasst und mit dem Gummistempel einer Spritze durch einen 70 µm Filter gedrückt, wobei mehrmals mit RPMI nachgespült wurde. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse mittels Erythrozytenlyse-Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Herstellerangaben, wobei die Inkubation mit dem Lysepuffer auf 5 Minuten reduziert wurde. Nach der Erythrozytenlyse wurden die Milzzellen und die Lymphknotenzellen gepoolt und in PBS-Puffer (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) gewaschen. Die Zellen wurden entweder mit 1000 ng/ml CXCL10 (R&D Systems) in PBS-Puffer (stimuliert) oder in PBS-Puffer alleine (unstimuliert) für 20 Minuten bei 37°C (Wärmebad, GFL, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurden direkt 5×10^7 bis 1×10^8 stimulierte oder unstimulierte Zellen in naive Rezipientenmäuse injiziert. ½ - 1 Stunde vor der Injektion wurden die Rezipientenmäusen mit einer nicht-irritativen Dosis von 0,25% DNFB an den Ohren behandelt. Die Messung der Ohrdicke erfolgte vor dem Auslösen der Zweitantwort und 24, 48 und 72 Stunden danach mit einem Mikrometer (Oditest, Kröplin, Schlüchtern, Deutschland). Als Kontrollen sind Mäuse nur mit 0,25% DNFB an den Ohren behandelt worden, ohne Zellen injiziert zu bekommen.

3.4 Nukleinsäuren-Analyse

3.4.1 Homogenisierung

Die zu homogenisierenden Hautproben (murin oder human) wurden mit flüssigem Stickstoff übergossen, in Alufolie gewickelt und mit einem Hammer zerkleinert. Die Probenstücke wurden in einen in Flüssigstickstoff vorgekühlten Teflon-Schüttelbehälter (Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) zusammen mit einer vorgekühlten Stahlkugel (Braun Biotech International) gegeben und ebenfalls für ca. eine Minute in flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurde der die Proben enthaltene Schüttelbehälter 1 Minute bei 2000 U/min in einem Mikrodismembrator, Model U (B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) geschüttelt und danach erneut für 1 Minute in Flüssigstickstoff gekühlt. Das Prozedere wurde zwei weitere Male wiederholt und die nun homogenisierten Hautproben in 5 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und umgehend bei –80 °C eingefroren.

Vor Gebrauch wurden die Schüttelbehälter gründlich mit RNase-Zap (Ambion, Huntingdon, UK) gereinigt und mit 70%igen Alkohol (Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland) und DEPC-Wasser (Wasser für die Molekularbiologie, ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gespült.

3.4.2 RNA Extraktion

Den homogenisierten und trizolisierten Hautproben wurde nach dem Auftauen Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben (0,2 ml Chloroform auf 1 ml Trizol) und das Gemisch geschüttelt. Nach 2- bis 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten 20 Minuten Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge mit Sorvall SA-600 Rotor). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein neues PP-Tube (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und das äquivalente Volumen Isopropanol (Fluka, Buchs, Schweiz) (vorgekühlt auf –20 °C) dazugegeben. Bei Proben mit wenig Ausgangsmaterial wurde 1 µl Glycogen (Roche, Mannheim, Deutschland) zugegeben, um ein besser sichtbares Pellet zu erhalten. Es folgte eine Fällung über Nacht bei –20 °C. Anschließend wurden die Proben 20 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C

zentrifugiert und der Überstand abgegossen und verworfen. Danach wurde das RNA Pellet in 50 µl DEPC Wasser 10 Minuten lang gelöst (auf Eis) und anschließend durch auf- und abpipettieren resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß (Biopur, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C .

3.4.3 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurenkonzentration wurde mit einem Spektralphotometer (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde die Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen, wobei die Absorption bei 280 nm den Proteingehalt der Lösung und die Absorption bei 320 nm die Streuung angibt. Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit der Nukleinsäureproben an. Bei einer sauberen Aufarbeitung liegt er bei $\geq 1,8$. 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.

3.4.4 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA zu cDNA wurde in einem Thermocycler (Trio-Thermoblock mit Trio Heated Lid, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden 4 µg RNA eingesetzt. Zur Vermeidung einer Kontamination durch genomische DNA wurde zunächst eine DNase Behandlung durchgeführt. Dazu wurden 10 µl RNA in ein PCR-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und 6 µl DNase Mix (bestehend aus 1,5 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1 µl RNASin (Roche, Mannheim, Deutschland), 1 µl DNase I (Roche, Mannheim, Deutschland)) addiert und im Thermocycler für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNase durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und es folgte eine Abkühlung der Probe auf 4°C . Für die reverse Transkription wurden zunächst sowohl 3,6 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) als auch 0,4 µl Random Primer (0,5

µg/µl) (Promega, Mannheim, Deutschland) hinzugegeben und für 2 min auf 42°C erwärmt. Der Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer induziert die Umschreibung von poly(A)⁺ mRNA und der Random Primer die von totaler RNA. So ist sichergestellt, dass RNA aus allen Quellen umgeschrieben wird. Zur Fortsetzung der reversen Transkription wurde den Proben ein Reaktionsgemisch, bestehend aus 4,5 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1,5 µl dNTP Mix (10 nM) (Gibco BRL, Inc. Gaithersburg), DTT (0,1 M) (Invitrogen) und 1 µl RNasin (10000 U) (Roche, Mannheim, Deutschland), zugegeben und es folgte eine Inkubation für 2 Minuten bei 42°C im Thermocycler. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl Superscript II Reverse Transcriptase (10000 U) (Invitrogen) versehen und die Transkription bei 42°C für 50 Minuten durchgeführt, mit abschließender 10-minütiger Erhitzung auf 70°C zur Deaktivierung der Transkriptase.

Davon ausgehend, dass eine Umschreibung von RNA in cDNA im Verhältnis 1:1 stattgefunden hat, wurde, basierend auf der RNA-Konzentrationsmessung vor der RT-PCR, die Konzentration der cDNA mit DEPC-Wasser auf 10 ng/µl eingestellt.

3.4.5 Quantitative Real-Time PCR Analyse

Für die Durchführung der Quantitativen Real-Time PCR wurden zwei unterschiedliche Nachweismethoden verwendet.

Die erste Nachweismethode funktioniert mittels des Farbstoffes SYBR green. Dieser baut sich, während des Umschreibens der cDNA in Doppelstrang DNA, unspezifisch in die doppelsträngige DNA ein und beginnt dann, angeregt durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, zu fluoreszieren.

Die zweite Nachweismethode basiert auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET), welches besagt, dass sich ein Fluorochrom (F1) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen lässt und die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder abstrahlt. Bringt man in die Nähe von F1 ein zweites Fluorochrom (F2), dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (E1) entspricht, so wird die Energie von F1 an F2 weitergegeben und von diesem in Form von Licht mit der Wellenlänge E2 abgestrahlt. Für die

Quantitative Real-Time PCR wurden TaqMan® Probes verwendet, bei denen F1 als so genannter Reporter und F2 als so genannter Quencher nebeneinander auf dem selben Oligonucleotid sitzen. Bei dem Einbau des Nucleotids in die Doppelstrang DNA werden Reporter und Quencher von der herannahenden Polymerase abgespalten, wodurch der Reporter von dem Quencher getrennt wird und nun Licht mit der Wellenlänge E1 abgeben kann, welches vorher von dem Quencher abgefangen wurde. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reportermoleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke.

Für die Quantifizierung nimmt man die Zykluszahl (CT-Wert), bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund abhebt und die Vermehrung der DNA exponentiell verläuft. Parallel zu den zu quantifizierenden Proben werden cDNA-Plasmide des Zielgenes, deren Konzentration bekannt ist, amplifiziert und aus den CT-Werten eine Standardkurve erstellt. Aus dieser lässt sich, anhand ihrer CT-Werte, auf die cDNA Menge der zu untersuchenden Proben schließen.

3.4.5.1 TaqMan® Probe Nachweismethode

Es wurden 25 ng cDNA eingesetzt. Dazu wurden von der nach der RT-PCR erhaltenen cDNA (10 ng/µl) 2,5 µl entnommen und mit 7,5 µl DEPC-Wasser (ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in eine Vertiefung einer 96-Well-Reaktionsplatte (Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, USA) gegeben. Zu der verdünnten cDNA wurden 15 µl eines Reaktionsgemisches, bestehend aus 12,5 µl TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0,625 µl genspezifischer TaqMan® Probes, 0,5 µl genspezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 0,5 µl DEPC-Wasser, zugefügt. Anschließend wurde die Quantitative Real-Time PCR in einem Real-Time PCR-Gerät (AbiPrism7000, Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Amplifizierung der cDNA erfolgte bei 50°C für 2 Minuten, 95°C für 10 Minuten und 40 Wiederholungen 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Zur internen Positivkontrolle wurden je 0,125 µl 18S RNA-spezifische Sonde und Primer eingesetzt (Applied Biosystems). Mit dem Fluorochrom FAM markierte Oligonucleotide dienten als genspezifische

TaqMan® Probes. Chemokinspezifische Primer und TaqMan® Probes 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 Herrn Dr. Albert Zlotnik, DNAX, Palo Alto, USA zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems) und mit Excel-Tabellenkalkulation (Microsoft Office Excel 2003) und die Expression des Zielgens in fg pro 25 ng eingesetzte cDNA wurde ermittelt. Dabei wurde die Expression des Zielgens nach der Expression der 18S RNA normalisiert.

3.4.5.2 SYBR green Nachweismethode

Die Durchführung der Quantitativen Real-Time PCR mit dem Farbstoff SYBR green erfolgte in derselben Art und Weise, wie die TaqMan® Probe Nachweismethode. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der cDNA ein anderes Reaktionsgemisch, bestehend aus 2,5 µl genspezifischem Primermix (2 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer) und 12,5 µl SYBR green Mastermix (Applied Biosystems), zugegeben wurde.

3.5 Immunhistochemie

Für immunohistochemische Analyse wurden von den NiSO₄- und SLS-Patch Test Hautproben 8 µm dicke Gefriermikrotomschnitte auf Superfrost-plus-Objektträgern (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Die Präparate wurden in Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Um eine Peroxidase-Aktivität zu vermeiden wurden die Präparate für 5 Minuten mit 0,6% H₂O₂ (ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) vorbehandelt. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen mit einem Avidin/Biotin-Blocking-Kit (VECTOR Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) abgesättigt. Es folgte die Färbung der Präparate mit den Primärantikörpern gegen die untersuchten Chemokine. Dabei wurden folgende Inkubationszeiten eingehalten: CXCL9/MIG (goat IgG, R&D Systems, Minneapolis, MN) 2

Stunden bei Raumtemperatur, CXCL10/IP-10 (both goat IgG; R&D Systems) 2 Stunden bei Raumtemperatur und CXCL12/SDF-1 α (K15C; mIgG1; Unite d'Immunologie Virale, Institute Pasteur, Paris, France) 2 Stunden bei 37°C (Wärmeschrank). Danach wurden die Präparate zweimal 5 Minuten in PBS-Puffer (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 0,15 g NaH₂PO₄ x H₂O; 0,2 g KH₂PO₄ ad 1 l H₂O, pH 7,2-7,4) gewaschen und mit einem Streptavidin-gekoppelten sekundären Antikörper versehen, der an den primären Antikörper bindet und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden dabei Antikörper gegen die jeweils verwendete Immunglobulingattung des Primärantikörpers aus Vectastain-ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) oder Vector-Elite-Kits (Vector Laboratories) verwendet. Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit einem AEC-Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Hämatoxylin (Sigma, Seelze, Deutschland) für 20 Sekunden gegengefärbt und mit gesättigter Lithiumcarbonat-Lösung (Sigma) kontrastiert und eingedeckt (Mounting Medium for AEC Cat. No. 1479, Immunotech, Marseille, Frankreich). Die digitalen Photos wurden an einem Leitz Orthoplan-Mikroskop mit einer Olympus Camedia C-4040 Digitalkamera aufgenommen. Die Photos sind mit Adobe Photoshop 7 nachbearbeitet worden (Schärfen, Tonwertkorrektur), um einen einheitlichen Bildhintergrund zu erhalten, ohne die Inhalte und Aussagen der Bilder zu verändern.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Strukturelle Zellen der Haut

Humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten, Melanozyten und dermale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden alle von Clonetics (San Diego, CA, USA) käuflich erworben und in Keratinozytenmedium (KGM-2), Fibroblastenmedium (FGM-2), Melanozytenmedium oder Endothelzellmedium (EGM-2) (alle von Clonetics) kultiviert.

Die Zellen wurden mit TNF- α (10 ng/ml)/IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (20 ng/ml) oder IL-4 (50 ng/ml) (alle von R&D Systems, Minneapolis, USA) für 18 Stunden

stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen trizolisiert (Trizol, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und die RNA extrahiert (siehe 3.4.2 und 3.4.3), in cDNA umgeschrieben (siehe 3.4.4) und Quantitative Real-Time-PCR Analysen der Chemokinexpression durchgeführt (siehe 3.4.5).

Die Rohdaten der Quantitative Real-Time-PCR Analysen sind mir von Herrn Prof. Dr. Homey für diese Arbeit zur Verfügung gestellt worden.

3.6.2 DNP-spezifische T-Zellklone

Um Antigen-spezifische T-Zelllinien zu generieren sind aus von Dinitrochlorobenzen (DNCB)-sensibilisierten Blutspendern T-Zellen isoliert worden. Die T-Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Kavität einer 24-Well-Platte in RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), welches 10 µg/ml Dinitrophenyl (DNP; Merck, Darmstadt, Deutschland) –Antigen enthielt, kultiviert. Nach 6 Tagen wurde den T-Zellen humanes rIL-2 (Sigma, Helsinki, Finnland) (50 IU/ml) hinzugegeben und am neunten Tag wurde die Konzentration von rIL-2 auf 25 IU/ml eingestellt. Die T-Zelllinien wurden expandiert und durch einen Proliferationsassay der Stimulationsindex (SI) ermittelt. Die Zelllinien mit dem höchsten SI für DNP wurden nach der „limiting dilution methode“ geklont. Die am gesündesten wirkenden Klone wurden erneut mit DNP stimuliert und anhand des SI konnten 80 Klone als DNP-spezifisch ermittelt werden. Diese Klone wurden in Kultur weiter expandiert und anschließend für weitere Experimente verwendet.

Die DNP-spezifischen T-Zellklone wurden mit 10 µg/ml DNP oder mit 200 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA, Sigma, Helsinki, Finnland) stimuliert, mit Trizol (Gibco BRL, Paisley, UK) homogenisiert und die RNA extrahiert (siehe 3.4.2 und 3.4.3). Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe 3.4.4) und die CD25 und IFN-γ Expression mittels Quantitativer Real-Time PCR ermittelt (siehe 3.4.5).

Die DNP-spezifischen T-Zellklone wurden am Finnish Institute of Occupational Health in Helsinki generiert und die RNA von Herrn Dr. Antti Lauerma zur Verfügung gestellt. Die Rohdaten der Quantitativen Real-Time PCR Analyse sind mir für diese Arbeit von Herrn Prof. Dr. Homey zur Verfügung gestellt worden.

3.6.3 Isolation von T-Zellen

Zunächst wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus „buffy coat“-Präparaten aus der örtlichen Blutbank gewonnen. Dazu wurde das Blut 1:1 mit RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt, 1/3 Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurde in ein Reaktionsgefäß (Falcontube, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) vorgelegt und vorsichtig mit 2/3 Blut-RPMI-Gemisch überschichtet. Anschließend wurde die Leukozytenpopulation durch Dichtegradienten-zentrifugation (RT, 20 min, 1000 rpm, deaktivierte Zentrifugen-bremse, Heraeus Minifuge T mit Rotor #2250) gewonnen. Die sich in einer wolkigen Phase oberhalb der Interphase ansammelnden Leukozyten wurden abpipettiert. Danach wurden in der gewonnenen Leukozytenfraktion die Erythrozyten lysiert, indem ein Erythrozytenlyse-Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Protokoll des Herstellers benutzt wurde. Nach der Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten in Säulen-Puffer (T-cell Enrichment Column Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) resuspendiert und auf die T-Zellsäule des T-cell Enrichment Column Kit (R&D Systems) gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule mit Waschpuffer (T-cell Enrichment Column Kit, R&D Systems) gespült und die isolierten T-Zellen in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI und der Zugabe von 2% FCS (Fetal Calf Serum, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) wurden die T-Zellen über Nacht bei 4° C aufbewahrt und am nächsten Tag für Chemotaxisexperimente verwendet.

3.7 Chemotaxisexperimente

Für die Durchführung der Chemotaxisexperimente wurde ein Transwell-System mit 3 µm Poren Einsätzen (Costar, Cambridge, USA) verwendet. Dieses Transwell-System besteht aus einer 24-Well-Platte in deren Kammern Einsätze eingehängt werden. Der Boden der Einsätze ist mit einer Membran ausgestattet, die mit 3 µm großen Poren durchsetzt ist. In die untere Kammer werden die Chemokine in gewünschter Konzentration gegeben und in den oberen Einsatz die T-Zellen.

Am Vortag wurde der C-Puffer bestehend aus RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, Seelze, Deutschland) und 1% HEPES-Puffer (Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien) angesetzt, sterilfiltriert und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ equilibriert.

Die Transwellplatte wurde mit Sigmacote (Sigma, Seelze, Deutschland) beschichtet, um ein Anheften der migrierten Zellen an den Boden der Platte zu vermeiden. Die Chemokine wurden in gewünschter Konzentration in C-Puffer in die untere Kammer der Transwell-Platte gegeben. Dabei wurden folgende Chemokine als rekombinante, humane Proteine verwendet: CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α und CCL27/CTACK (alle von R&D Systems, Minneapolis, USA). Die T-Zellen wurden zweimal in C-Puffer gewaschen und 1 x 10⁶ T-Zellen in 100 μ l in den oberen Einsatz gegeben. Die Migration erfolgte bei 37 °C und 5%CO₂ für 3 Stunden. Danach wurden die Einsätze herausgenommen. Für die spätere Auswertung wurden zu den migrierten T-Zellen 50 μ l 15- μ m-Microbeads (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA) in die Kammern gegeben. Die Microbeads wurden vorher in C-Puffer verdünnt (10 μ l Beads + 490 μ l C-Puffer). Die migrierten Zellen wurden anschließend in FACS-Röhrchen (Falcon 2052, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) überführt und einmal mit FACS-Puffer (PBS-Puffer (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland), 1% BSA und 0,1% NaN₃ (Sigma, Seelze, Deutschland) gewaschen (10 Minuten Zentrifugation., 1200 rpm, 4 °C, Hettich 1302 mit Rotor #1323). Um die Migration der CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen bestimmen zu können, wurden die migrierten T-Zellen im Anschluss mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt. Dazu wurden folgende Antikörpermengen pro Ansatz verwendet: 7 μ l anti-human-CLA, FITC konjugiert, Klon HECA-452, 5 μ l anti-human-CD4, CyChrome konjugiert, Klon RPA-T4 und 5 μ l anti-human-CD8, PE konjugiert, Klon RPA-T4 (alle von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Die Inkubationszeit der Antikörper betrug 30 Minuten bei 4 °C. Darauf wurden die T-Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend wurde die Färbung durch die Zugabe von 200 μ l PBS-Puffer mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Zu jeder Färbung wurde eine Isotypkontrolle mit gleicher Konzentration und gleichen Färbebedingungen mitgeführt. Dabei diente für den anti-CLA Antikörper ein FITC konjugierter Ratte IgM Antikörper, für den anti-CD4 Antikörper ein CyChrome konjugierter Maus

IgG₁ und für den anti-CD8 ein PE konjugierter Maus IgG₁ als Isotypkontrolle (alle von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Die Fluoreszenzanalyse erfolgte mit einem Durchflusszytometer vom Typ FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). In der Durchflusszytometer-Aufnahme bilden beim Auftragen der Zellen nach Größe und nach Granularität die Leukozyten und die Microbeads jeweils eine charakteristische Wolke. Um die beiden Wolken ist jeweils ein Gate gelegt worden, in dem die Leukozyten und die Microbeads bei der Aufnahme gezählt wurden. Mittels einer Quadrantenstatistik der CellQuest Software (Becton Dickinson) konnte ermittelt werden, wieviele Zellen von den Leukozyten im Gate CD4+, CD8+ und CLA+ waren. Da in jeden Ansatz dieselbe Menge Microbeads gegeben wurde, konnte die prozentuale Migration aus dem Verhältnis Zellen/Microbeads bestimmt werden. Dazu wurde das Verhältnis Zellen/Microbeads einer mitgeführten Startpopulation als 100% Migration verwendet und davon die prozentualen Anteile der Verhältnisse Zellen/Microbeads der migrierten Zellen berechnet. Um die Startpopulation zu erhalten wurden 1×10^6 T-Zellen direkt in die untere Kammer der Transwell Platte gegeben und ansonsten wie die Zellen in den Einsätzen gleichbehandelt. Als negative Kontrolle wurde statt einer Chemokinkonzentration nur C-Puffer in die untere Kammer der Transwell Platte gegeben. Alle Experimente wurden in 3-fach Ansätzen durchgeführt.

In zwei Experimenten sind die T-Zellen für 2 Stunden bei 37°C mit 100 ng/ml Pertussistoxin (Calbiochem Merck Biosciences, Bad Soden, Deutschland) inkubiert worden, bevor sie im Anschluss für den Chemotaxisassay verwendet wurden.

Zusätzlich sind Experimente durchgeführt worden, in denen die T-Zellen mit Medium, CXCL12 (10 ng/ml) oder CXCL10 (1000 ng/ml) für 45 Minuten bei 37°C vorinkubiert wurden, bevor sie in das Transwell System gegeben wurden.

3.8 Shrunken Centroid Analyse

Die Shrunken Centroid Analyse wurde nach Tibshirani et al. (Tibshirani *et al.*, 2002) durchgeführt. Diese Methode errechnet 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 logarithmisierte Expressionsdaten aus Quantitativen Real-Time Analysen eingesetzt, so dass sich eine einheitenlose Darstellung ergibt. Die Abbildung 4.9 wurde mit Hilfe von PAM (Prediction Analysis for Microarrays) für Microsoft Excel, einer Schnittstelle für das R-Statistikpaket (beide unter GPL verfügbar), bei einem gewählten Schwellenwert von 0 generiert und mit CorelDraw 11 coloriert.

3.9 Statistische Methoden

Die in dieser Arbeit angewendeten statistischen Tests wurden alle mit Hilfe von Microsoft Excel (Office 2003) durchgeführt.

Dabei wurde zunächst durch eine Varianzanalyse (F-Test) die Gleichheit der beiden zu vergleichenden Stichprobenvarianzen überprüft. Bei Gleichheit der Varianzen wurde anschließend ein t-Test vom Typ 2 und bei einer nicht-Gleichheit ein t-Test vom Typ 3 durchgeführt. Dabei wurden P-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3.10 Geräte

Zentrifugen

- Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit Sorvall SA-600 Rotor
- Heraeus Minifuge T mit Rotor #2250
- Hettich 1302 mit Rotor #1323
- Hettich Rotixa/RP, Rotor #2250
- Heraeus Labefuge 400, Rotor #8177

Die übrigen verwendeten Geräte sind jeweils im Text aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Chemokinexpression in Mausmodellen für Chemikalien-induzierte irritative und allergische Hautentzündungen.

In einer umfassenden Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit im Mausmodell das Chemokinexpressionsprofil in Chemikalien-induzierten irritativen und allergischen Hautreaktionen und die Regulation der Chemokine ermittelt.

In BALB/c Mäusen wurden irritative Hautreaktionen durch das Standardirritanz Crotonöl (2%) hervorgerufen. Allergische Hautreaktionen wurden durch das Hapten Dinitrofluorobenzol (DNFB) erzeugt. Dazu wurden die Mäuse am Tag 0 mit einer irritativen Dosis des Haptens (0,5%) am Bauch sensibilisiert. Am Tag 6 erfolgte die Auslösung der allergischen Zweitantwort mit 0,2% DNFB (nicht-irritative Dosis) an den Ohren. Als weitere Kontrollen wurden Tiere mit 0,5% DNFB und mit Vehikel an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 und 72 Stunden Chemikalienexposition wurde die Ohrschwellung gemessen, die Tiere getötet und die Ohren gewonnen. Aus der Epidermis wurde die RNA extrahiert und für Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen verwendet. Die Untersuchungen der Chemikalien-induzierten Ohrschwellungen zeigten homogene Reaktionsmuster, so dass die RNA von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt wurde.

Anhand der Untersuchung der Ohrschwellung konnte gezeigt werden, dass die irritativen Hautreaktionen nach Behandlung mit 2% Crotonöl vergleichbar starke Entzündungsreaktionen hervorriefen, wie die DNFB-induzierte allergische Zweitantwort (Abbildung 4.1 a). Damit konnten in den allergischen und irritativen Hautreaktionen distinkte Chemokinexpressionsprofile unabhängig vom Grad der Entzündung unterschieden werden. Gleichzeitig zeigten die Ohrschwellungen den zeitlichen Verlauf der irritativen und allergischen Kontaktdermatitis in den untersuchten BALB/c Mäusen. Die irritative Entzündungsreaktion begann bereits nach 6 Stunden, hatte bei 12 Stunden ihren Höhepunkt und klang nach 24 und 72 Stunden wieder ab. Die allergische Hautreaktion erfolgte später. Die Ohrschwellung nahm erst bei 12 Stunden zu und erreichte bei 24 Stunden den höchsten Wert.

Mittels Quantitativer Real-Time (RT)-PCR Analyse konnte in der Epidermis von BALB/c Mäusen das Chemokinexpressionsprofil während Chemikalien-

induzierter allergischer und irritativer Kontaktdermatitis ermittelt werden. Die Chemokine ließen sich nach ihren Regulationsmustern in homöostatisch, unspezifisch/entzündungsabhängig und Allergen/Hapten-spezifisch regulierte Chemokine einteilen (Tabelle 4.1). Homöostatisch regulierte Chemokine wurden konstitutiv in der Epidermis von BALB/c Mäusen exprimiert. Allergen/Hapten-spezifisch regulierte Chemokine wurden selektiv nur während durch das Allergen/Hapten hervorgerufenen Hautreaktionen induziert. Als unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine wurden Chemokine eingeteilt, die generell in inflammatorischen Prozessen induziert wurden und somit sowohl in allergischen, als auch in irritativen Hautreaktionen nachweisbar waren.

Tabelle 4.1 Regulation der Chemokinexpression während Chemikalien-induzierter allergischer (AKD) oder irritativer (IKD) Kontaktdermatitis im Mausmodell. Klassifikation nach homöostatischen, unspezifisch/entzündungsabhängigen oder Allergen/Hapten-spezifischen Regulationsmustern.

Chemokine		Regulation			
Systematisch	Synonym	homöostatisch	unspezifisch	unspezifisch, dominant in AKD	Allergen/Hapten-spezifisch
CCL1	<i>TCA-3</i>		x		
CCL2	<i>MCP-1</i>			x	
CCL3	<i>MIP-1α</i>		x		
CCL4	<i>MIP-1β</i>		x		
CCL5	<i>RANTES</i>			x	
CCL7	<i>MCP-3</i>			x	
CCL10	<i>MIP-1γ</i>		x		
CCL11	<i>Eotaxin</i>		x		
CCL17	<i>TARC</i>		x		
CCL19	<i>MIP-3β</i>		x		
CCL20	<i>MIP-3α</i>		x		
CCL21	<i>6Ckine</i>	x			
CCL22	<i>MDC</i>		x		
CCL27	<i>CTACK</i>	x			
CXCL9	<i>MIG</i>				x
CXCL10	<i>IP-10</i>				x
CXCL14	<i>BRAK</i>	x			
XCL1	<i>Lymphotactin</i>	x			
CX3CL1	<i>Fractalkine</i>	x			

In dem untersuchten murinen Modell sind 2 Allergen/Hapten-spezifische Chemokine (CXCL9/*MIG* und CXCL10/*IP-10*), 12 unspezifische Chemokine (CCL1/*I-309*, CCL2/*MCP-1*, CCL3/*MIP-1 α* , CCL4/*MIP-1 β* , CCL5/*RANTES*, CCL7/*MCP-3*, CCL10/*MIP-1 γ* , CCL11/*Eotaxin*, CCL17/*TARC*, CCL19/*MIP-3 β* , CCL20/*MIP-3 α* und CCL22/*MDC*) und 5 homöostatische Chemokine (CCL21/*6Ckine*, CCL27/*CTACK*, CXCL14/*BRAK*, XCL1/*Lymphotactin* und CX3CL1/*Fractalkine*) identifiziert worden (Tabelle 4.1).

Um die zugrunde liegenden Einteilungskriterien näher zu erläutern, sind im Folgenden einige Allergen/Hapten-spezifische, unspezifische und homöostatische Chemokine als Beispiele herausgegriffen worden.

CXCL9/*MIG* und CXCL10/*IP-10* beides Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3, wurden selektiv nur während Allergen/Hapten-spezifischer Entzündung induziert (Abbildung 4.1 b-c) und erreichten parallel zur Stärke der Hapten-induzierten Entzündung (Ohrschwellungen, Abbildung 4.1 a) ihr Maximum nach 24 Stunden Haptenexposition. In den durch Crotonöl hervorgerufenen, irritativen Entzündungsreaktionen fand hingegen keine Induktion der CXCL9 oder CXCL10 Expression statt, obwohl die Stärke der Hautreaktion mit der Stärke der allergischen Hautreaktion identisch war (Abbildung 4.1 a). Ebenso wenig induzierte die irritative Dosis des Allergens (0,5% DNFB) die Expression der beiden CXCR3-Liganden.

CCL3/*MIP-1 α* , CCL11/*Eotaxin* und CCL20/*MIP-3 α* sind Beispiele für unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine (Abbildung 4.2). CCL3 und CCL11 waren sowohl in den Allergen/Hapten-spezifischen, als auch in den Irritantz/Crotonöl-verursachten Entzündungsreaktionen induzierbar (Abbildung 4.2 b, c). Die CCL3- und CCL11-Expression war in den allergischen und irritativen Hautreaktionen gleich stark und verlief in Korrelation mit dem zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktionen (Ohrschwellung) (Abbildung 4.2 a). CCL20/*MIP-3 α* ist ein Beispiel für ein unspezifisch/entzündungsabhängig reguliertes Chemokin, das überwiegend in irritativen Hautreaktionen induziert wurde (Abbildung 4.2 d). In den durch Crotonöl hervorgerufenen, irritativen Entzündungsreaktionen folgte es dem Entzündungsverlauf und war nach 12 Stunden maximal exprimiert. Auch als Antwort auf die irritative Dosis von DNFB (0,5%) wurde CCL20 in BALB/c Mäusen ausgeprägt.

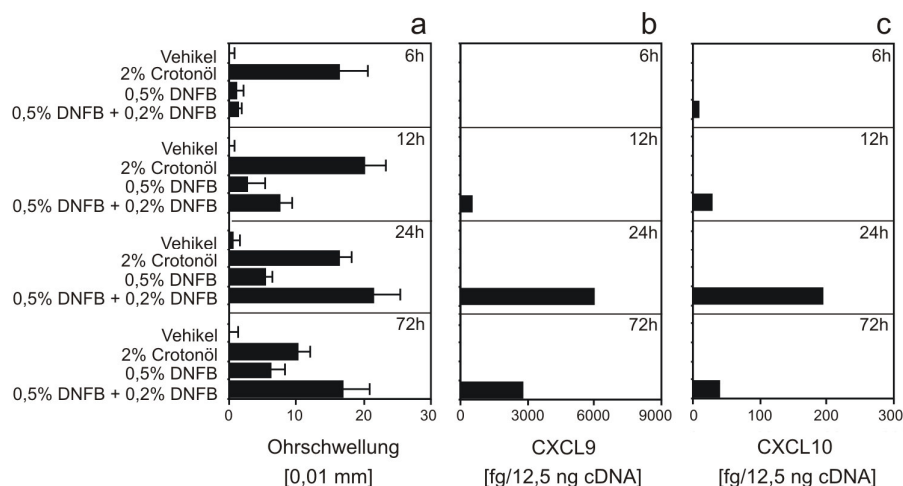


Abbildung 4.1: Allergen/Hapten-spezifisch regulierte Chemokine. Messung der Ohrschwellung (a) und Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CXCL9 und CXCL10 Expression in BALB/c Mäusen (b-c). Irritative Hautreaktionen wurden mit dem Standardirritanz Crotonöl (2%) erzeugt. Für die Auslösung allergischer Hautreaktionen wurden Mäuse am Tag 0 mit 0,5% DNFB (irritative Dosis) am rasierten Bauch sensibilisiert und am Tag 6 eine allergische Zweitanwort mit 0,2% DNFB (nicht-irritative Dosis) am Ohr ausgelöst. Als Kontrollen wurden Mäuse mit 0,5% DNFB oder mit Vehikel an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden Chemikalienexposition wurde die Ohrschwellung gemessen und die Ohren gewonnen, die Epidermis von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt und daraus die RNA extrahiert. Die PCR-Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 12,5 ng eingesetzter cDNA und die Ohrschwellungen als Mittelwerte (n=5) + Standardabweichungen dargestellt.

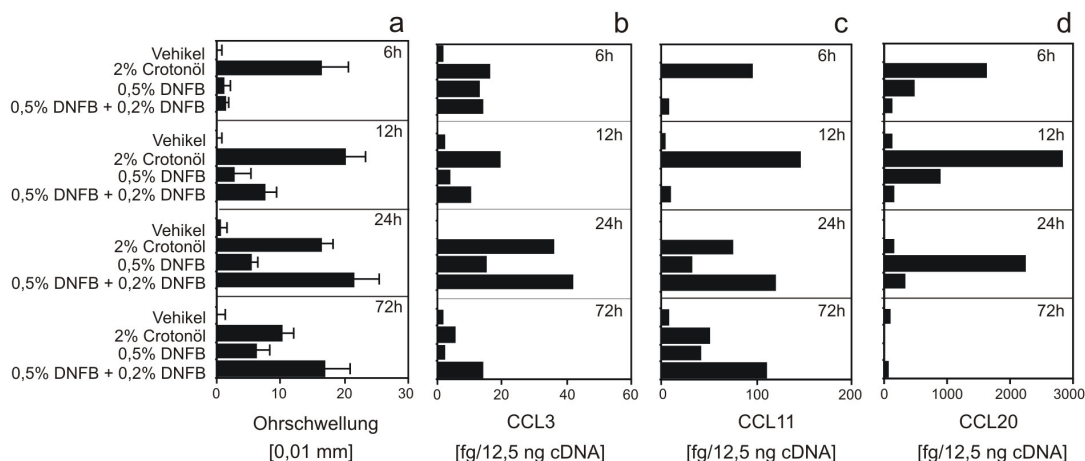


Abbildung 4.2: Unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine. Messung der Ohrschwellung (a) und Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL3, CCL11 und CCL20 Expression in BALB/c Mäusen (b-d). Irritative Hautreaktionen wurden mit dem Standardirritanz Crotonöl (2%) erzeugt. Für die Auslösung allergischer Hautreaktionen wurden Mäuse am Tag 0 mit 0,5% DNFB (irritative Dosis) am rasierten Bauch sensibilisiert und am Tag 6 eine allergische Zweitanwort mit 0,2% DNFB (nicht-irritative Dosis) am Ohr ausgelöst. Als Kontrollen wurden Mäuse mit 0,5% DNFB oder mit Vehikel an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden Chemikalienexposition wurde die Ohrschwellung gemessen und die Ohren gewonnen, die Epidermis von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt und daraus die RNA extrahiert. Die PCR-Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 12,5 ng eingesetzter cDNA und die Ohrschwellungen als Mittelwerte (n=5) + Standardabweichungen dargestellt.

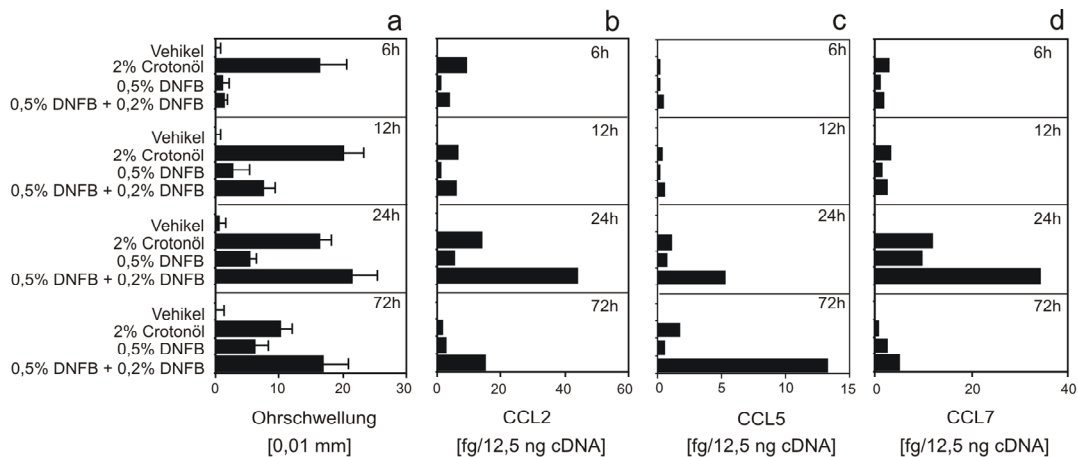


Abbildung 4.3: Unspezifisch regulierte Chemokine, die dominant in allergischen Hautreaktionen induziert werden. Messung der Ohrschwellung (a) und Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL2, CCL5 und CCL7 Expression in BALB/c Mäusen (b-d). Irritative Hautreaktionen wurden mit dem Standardirritanz Crotonöl (2%) erzeugt. Für die Auslösung allergischer Hautreaktionen wurden Mäuse am Tag 0 mit 0,5% DNFB (irritative Dosis) am rasierten Bauch sensibilisiert und am Tag 6 eine allergische Zweitanwort mit 0,2% DNFB (nicht-irritative Dosis) am Ohr ausgelöst. Als Kontrollen wurden Mäuse mit 0,5% DNFB oder mit Vehikel an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden Chemikalienexposition wurde die Ohrschwellung gemessen und die Ohren gewonnen, die Epidermis von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt und daraus die RNA extrahiert. Die PCR-Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 12,5 ng eingesetzter cDNA und die Ohrschwellungen als Mittelwerte (n=5) + Standardabweichungen dargestellt.

In der kontaktallergischen Hautreaktion war die Expression von CCL20 nach 24 Stunden Haptenexposition schwach sichtbar.

Neben den eindeutig Allergen/Hapten-spezifisch und den eindeutig unspezifisch/entzündungsabhängig regulierten Chemokinen sind Chemokine identifiziert worden, die eine Grauzone zwischen Allergen-spezifischer und unspezifischer Regulation darstellten. Diese Chemokine (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und CCL7/MCP-3) wurden sehr dominant in kontaktallergischen Hautreaktionen induziert, dennoch war eine leichte Expression in den Crotonöl- oder 0,5% DNFB-induzierten irritativen Hautreaktionen zu beobachten (Abbildung 4.3). Da in den Vehikel-behandelten Kontrolltieren die Expression von CCL2, CCL5 und CCL7 nicht nachweisbar war, muss hier von einer leichten Induktion der Chemokine in den irritativen Hautreaktionen gesprochen werden.

CCL2 und CCL7 wurden in den DNFB-induzierten, kontaktallergischen Reaktionen deutlich stärker ausgeprägt als in den irritativen Hautreaktionen, waren aber in den Crotonöl-behandelten Tieren, vor allem nach 24 Stunden Crotonölexposition, ebenfalls nachweisbar (Abbildung 4.3 b, d). CCL5 war ebenfalls dominant Allergen/Hapten-spezifisch exprimiert, mit einem Maximum bei 72 Stunden, dennoch ist eine leichte Expression in den durch Crotonöl und durch 0,5% DNFB induzierten irritativen Hautreaktionen zu sehen.

Außer den inflammatorischen, Allergen/Hapten-spezifisch oder unspezifisch/entzündungsabhängig regulierten Chemokinen konnten homöostatische Chemokine, die konstitutiv in der Epidermis von BALB/c Mäusen exprimiert wurden, detektiert werden. CCL27/*CTACK*, CXCL14/*BRAK* und CX3CL1/*Fractalkine* sind homöostatisch regulierte Chemokine (Abbildung 4.4), die sowohl in der Vehikelkontrolle, als auch in den irritativen und allergischen Entzündungsreaktionen, unabhängig von der Dauer der Chemikalienexposition, ausgeprägt wurden.

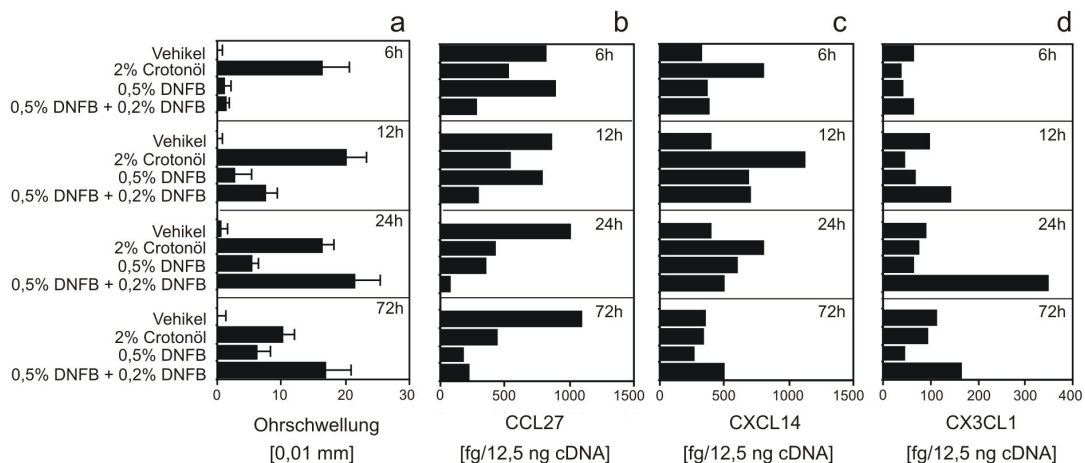


Abbildung 4.4: Homöostatisch regulierte Chemokine. Messung der Ohrschwellung (a) und Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL27, CXCL14 und CX3CL1 Expression in BALB/c Mäusen (b-d). Irritative Hautreaktionen wurden mit dem Standardirritanz Crotonöl (2%) erzeugt. Für die Auslösung allergischer Hautreaktionen wurden Mäuse am Tag 0 mit 0,5% DNFB (irritative Dosis) am rasierten Bauch sensibilisiert und am Tag 6 eine allergische Zweitanwort mit 0,2% DNFB (nicht-irritative Dosis) am Ohr ausgelöst. Als Kontrollen wurden Mäuse mit 0,5% DNFB oder mit Vehikel an den Ohren behandelt. Nach 6, 12, 24 oder 72 Stunden Chemikalienexposition wurde die Ohrschwellung gemessen und die Ohren gewonnen, die Epidermis von 5 Tieren pro Gruppe gepoolt und daraus die RNA extrahiert. Die PCR-Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 12,5 ng eingesetzter cDNA und die Ohrschwellungen als Mittelwerte (n=5) + Standardabweichungen dargestellt.

In der Analyse der Chemokinexpression im Mausmodell für Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis konnten Unterschiede in der Chemokinexpression in Allergen/Hapten-spezifischen, allergischen und Crotonöl-induzierten, irritativen Hautreaktionen ermittelt werden. Dabei traten vor allem die CXCR3 Liganden CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 in den Vordergrund, die deutlich Allergen/Hapten-spezifisch reguliert wurden und nicht in irritativen Hautreaktionen nachweisbar waren.

4.2 Analyse der Chemokinexpression in Chemikalien-induzierten irritativen und allergischen Hautreaktionen beim Menschen.

Vergleichend zu den Untersuchungen im Mausmodell wurde das Chemokinexpressionsprofil in Hautproben von humanen Probanden analysiert. Als humanes Modell für Chemikalien-induzierte allergische Kontaktdermatitis wurde an Patienten mit Nickelallergie (n=8) ein NiSO₄-Patch Test durchgeführt und nach 0, 2, 6 und 48 Stunden Hautproben entnommen. Für die Chemikalien-induzierte irritative Kontaktdermatitis diente der Natriumlaurylsulfat (SLS)-Patch Test, der ebenfalls bei Patienten mit Nickelallergie (n=8) durchgeführt wurde. Die Entnahme von Hautproben erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten. Die gewonnenen Hautproben wurden halbiert und in der einen Hälfte wurde, nach Extraktion der RNA, die Chemokinexpression mittels Quantitativer Real-Time (RT)-PCR Analyse untersucht. Die andere Probenhälfte wurde histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen.

Nach den Richtlinien der internationalen Contact-Dermatitis-Research-Gruppe wurde die klinische Klassifikation der NiSO₄- und SLS-Patch Test Reaktionen durchgeführt (Tabelle 4.2). Zusätzlich wurde von zwei Personen unabhängig die Stärke der Entzündungsreaktionen in von den Hautproben angefertigten histologischen Präparaten evaluiert (Tabelle 4.2).

Sowohl die klinische, als auch die histologische Klassifizierung des Grades der Chemikalien-induzierten Entzündungsreaktionen zeigten in den irritativen und in den allergischen Hautreaktionen gute Übereinstimmungen. Die im Nachfolgenden angeführten Unterschiede bzw. Übereinstimmungen in der Chemokinexpression sind demnach unabhängig vom Grad der Entzündung.

Tabelle 4.2 Klinische und histologische Klassifizierung der Testreaktionen von NiSO₄- und SLS-Patch Test Patienten (je n=8). Grad der Chemikalien-induzierten Entzündungsreaktionen: +, schwache Reaktion; ++ starke Reaktion; +++ sehr starke Reaktion;

	klinische Klassifizierung		histologische Klassifizierung	
	NiSO ₄	SLS	NiSO ₄	SLS
+	6	7	2	3
++	1	1	5	3
+++	1	0	1	2

4.2.1 Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analyse

In dem oben beschriebenen humanen Modell für Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis ist die Expression von insgesamt 26 Chemokinen mittels Quantitativer Real-Time (RT)-PCR Analyse untersucht worden. Ebenso wie im Mausmodell konnten die Chemokine anhand ihrer Regulationsmuster in homöostatische, unspezifisch/entzündungsabhängige und Allergen/Hapten-spezifische Chemokine eingeteilt werden.

Von den untersuchten Chemokinen waren 7 Chemokine (CCL21/6Ckine, CCL22/MDC, CCL27/CTACK, CXCL12/SDF-1 α , CXCL14/BRAK, XCL1/Lymphotactin und XC3CL1/Fractalkine) als homöostatisch reguliert, 14 Chemokine (CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL17/TARC, CCL18/DC-CK1, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL24/Eotaxin-2, CXCL1/Gro-1 und CXCL8/IL-8) als unspezifisch/entzündungsabhängig reguliert und 3 Chemokine (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC) als Hapten-spezifisch reguliert einzuordnen (Tabelle 4.3). Für zwei Chemokine (CCL7/MCP-3 und CCL13/MCP-4) war die Einordnung als Allergen/Hapten-spezifische oder unspezifisch/entzündungsabhängige Chemokine nicht eindeutig zu treffen.

Die CXCR3-Liganden CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC wurden in 7 von 8 Patienten nach 48 Stunden NiSO₄-Patch Test induziert, wohingegen sie in den untersuchten Hautproben von SLS-Patch Test Patienten nicht

induzierbar waren (Abbildung 4.5). CXCL9 wurden nur in einem der 8 untersuchten SLS-Patch Test Patienten in vergleichbarer Stärke zu den durch NiSO₄ hervorgerufenen allergischen Hautreaktionen exprimiert (Abbildung 4.5 a). In drei weiteren SLS-Patch Test Patienten war eine ganz schwache CXCL9 Expression nachweisbar. CXCL10 wurde in denselben SLS-Patch Test Patienten (Patient 1, 2, 3 und 7) schwach ausgeprägt (Abbildung 4.5 b). Eine geringe CXCL11 Expression war bei alle SLS-Patch Test Proben nachzuweisen (Abbildung 4.5 c). Allerdings erinnert die Expression eher an ein homöostatisches Regulationsmuster, denn sie war unabhängig vom Entzündungsverlauf auch nach 0 Stunden SLS-Exposition zu sehen. Die Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 war in den irritativen Hautreaktionen der SLS-Patch Test Patienten im Vergleich zu den allergischen Hautreaktionen der NiSO₄-Patch Test Patienten derart gering und folgte zudem auch keinem erkennbaren zeitlichen Ablauf, dass in den irritativen Hautreaktionen nicht von einer Induktion dieser Gene gesprochen werden kann. Die CXCL9 Expression in Patient 7 ist als Ausreißer zu werten. Somit gehören die CXCR3-Liganden im humanen Modell, in Korrelation zu den Ergebnissen im murinen Modell eindeutig zu den Allergen/Hapten-spezifisch regulierten Chemokinen.

CCL1/*I-309*, CCL2/*MCP-1*, CCL19/*MIP-3 β* und CCL20/*MIP-3 α* sind Beispiele für unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine (Abbildung 4.6). Sie wurden sowohl in den allergischen, als auch in den irritativen Hautreaktionen ausgeprägt. In den allergischen Hautreaktionen erreichten sie, analog zum Entzündungsverlauf ihre maximale Expression nach 48 Stunden NiSO₄-Exposition. CCL1 und CCL19 hatten auch in den SLS-induzierten Hautreaktionen ihre maximale Expression nach 48 Stunden SLS-Patch Test. CCL2 und CCL20 hingegen wurden in den SLS-induzierten, irritativen Hautreaktionen bei mehreren Patienten auch zu früheren Zeitpunkten, vorwiegend nach 6 Stunden SLS-Exposition, induziert (Abbildung 4.6 b, d) und folgten damit der in der irritativen Kontaktdermatitis bereits nach 2 bis 6 Stunden beginnenden Entzündungsreaktion.

CCL7/*MCP-3* und CCL13/*MCP-4* erschienen auf den ersten Blick Hapten/Allergen-spezifisch reguliert. Sie wurden in den Hapten-spezifischen Entzündungsreaktionen der NiSO₄-Patch Test Patienten wesentlich stärker

ausgeprägt als in den irritativen Hautreaktionen (Abbildung 4.7). Im Gegensatz zu den CXCR3-Liganden wurden CCL7 und CCL13 aber in den SLS-Patch Test Proben ausschließlich nach 48 Stunden exprimiert. Demnach muss auch in den SLS-Patch Test Patienten von einer leichten CCL7- und CCL13-Induktion gesprochen werden. Eine eindeutige Kategorisierung als Allergen/Hapten-spezifisch oder unspezifisch/entzündungsabhängig war demnach nicht möglich. Sie wurden ebenso, wie CCL7 und CCL2 in der Maus als unspezifisch reguliert mit dominanter Induktion in allergischen Hautreaktionen eingeordnet.

Tabelle 4.3 Regulation der Chemokinexpression während humaner Chemikalien-induzierter allergischer (AKD) oder irritativer (IKD) Kontaktdermatitis. Klassifikation nach homöostatischen, unspezifischen/entzündungsabhängigen oder Hapten/Allergen-spezifischen Regulationsmustern.

Chemokine		Regulation			
Systematisch	Synonym	homöostatisch	unspezifisch	unspezifisch, dominant in AKD	Hapten-spezifisch
CCL1	<i>I-309</i>		x		
CCL2	<i>MCP-1</i>		x		
CCL3	<i>MIP-1α</i>		x		
CCL4	<i>MIP-1β</i>		x		
CCL5	<i>RANTES</i>		x		
CCL7	<i>MCP-3</i>			x	
CCL8	<i>MCP-2</i>		x		
CCL11	<i>Eotaxin</i>		x		
CCL13	<i>MCP-4</i>			x	
CCL17	<i>TARC</i>		x		
CCL18	<i>DC-CK1</i>		x		
CCL19	<i>MIP-3β</i>		x		
CCL20	<i>MIP-3α</i>		x		
CCL21	<i>6Ckine</i>	x			
CCL22	<i>MDC</i>	x			
CCL24	<i>Eotaxin-2</i>		x		
CCL27	<i>CTACK</i>	x			
CXCL1	<i>Gro-1</i>		x		
CXCL8	<i>IL-8</i>		x		
CXCL9	<i>MIG</i>				x
CXCL10	<i>IP-10</i>				x
CXCL11	<i>I-TAC</i>				x
CXCL12	<i>SDF-1α</i>	x			
CXCL14	<i>BRAK</i>	x			
XCL1	<i>Lymphotactin</i>	x			
CX3CL1	<i>Fractalkine</i>	x			

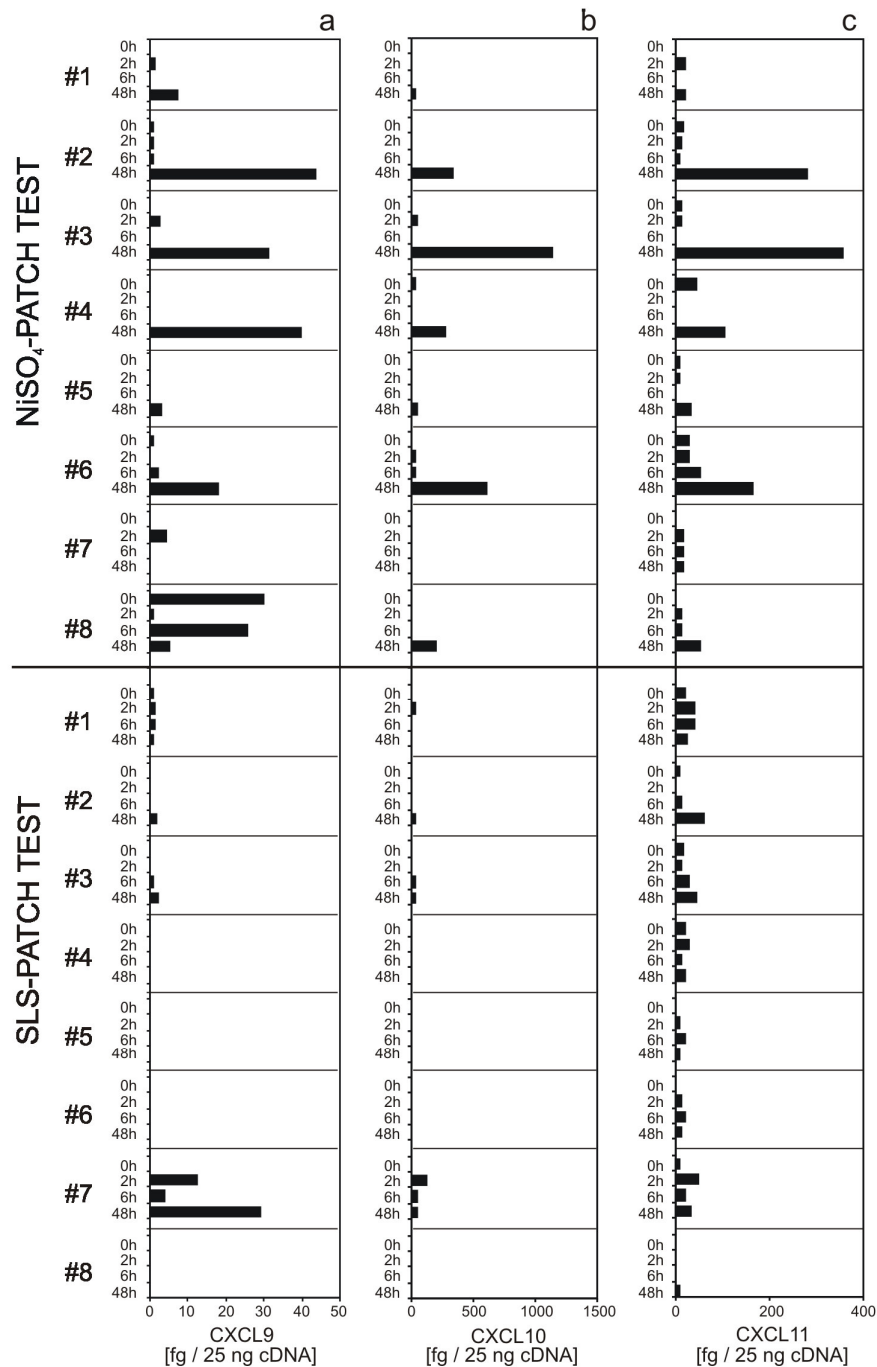


Abbildung 4.5: Allergen/Hapten-spezifisch regulierte Chemokine. Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CXCL9, CXCL10 und CXCL11 Expression in Hautproben von humanen Probanden. Als Modell für die allergische Kontaktdermatitis wurde ein NiSO₄-Patch Test in Patienten mit Nickelallergie (n=8) verwendet. Als Modell für die irritative Kontaktdermatitis wurde ebenfalls in Patienten mit Nickelallergie ein SLS-Patch Test verwendet (n=8). Nach 0, 2, 6 und 48 Stunden Chemikalienexposition wurden Hautproben entnommen, die RNA extrahiert und für die Quantitativen Real-Time RT-PCR Analysen verwendet. Die Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzter cDNA dargestellt.

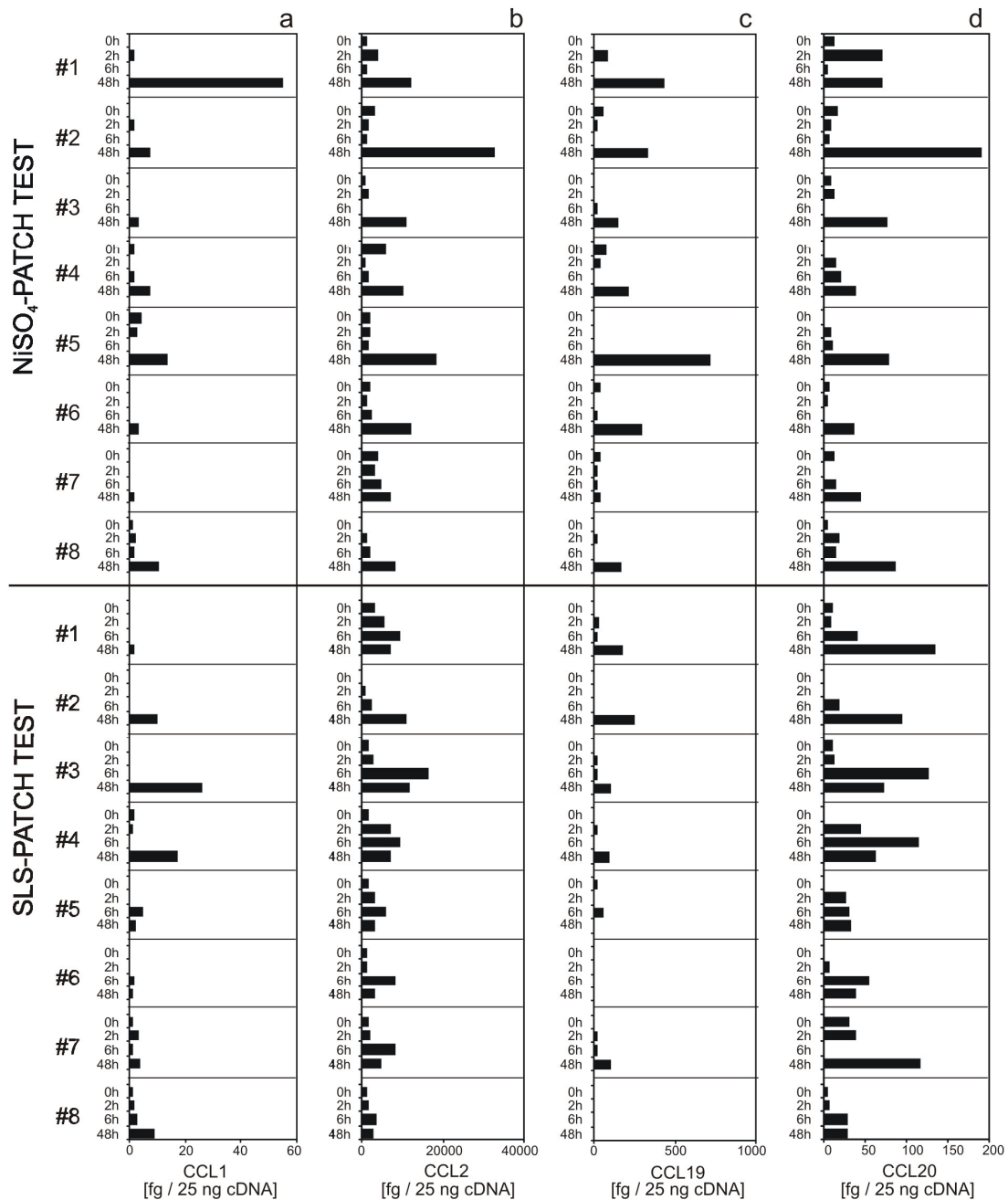


Abbildung 4.6: Unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine. Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL1, CCL2, CCL19 und CCL20 Expression in Hautproben von humanen Probanden. Als Modell für die allergische Kontaktdermatitis wurde ein NiSO₄-Patch Test in Patienten mit Nickelallergie (n=8) verwendet. Als Modell für die irritative Kontaktdermatitis wurde ebenfalls in Patienten mit Nickelallergie (n=8) ein SLS-Patch Test verwendet. Nach 0, 2, 6 und 48 Stunden Chemikalienexposition wurden Hautproben entnommen, die RNA extrahiert und für die Quantitativen Real-Time RT-PCR Analysen verwendet. Die Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzter cDNA dargestellt.

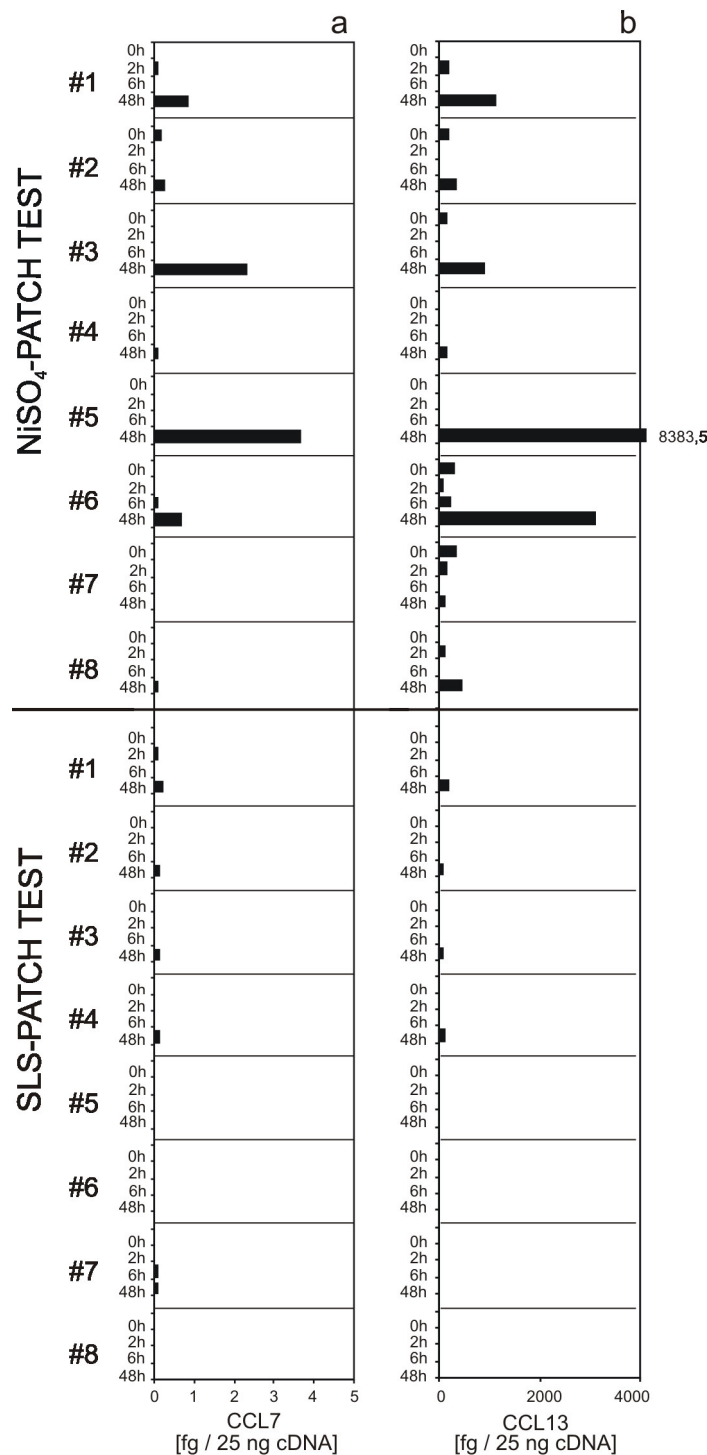


Abbildung 4.7: Unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokine, die dominant in allergischen Hautreaktionen ausgeprägt werden. Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL7 und CCL13 Expression in Hautproben von humanen Probanden. Als Modell für die allergische Kontaktdermatitis wurde ein NiSO₄-Patch Test in Patienten mit Nickelallergie (n=8) verwendet. Als Modell für die irritative Kontaktdermatitis wurde ebenfalls in Patienten mit Nickelallergie ein SLS-Patch Test verwendet (n=8). Nach 0, 2, 6 und 48 Stunden Chemikalienexposition wurden Hautproben entnommen, die RNA extrahiert und für die Quantitativen Real-Time RT-PCR Analysen verwendet. Die Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzter cDNA dargestellt.

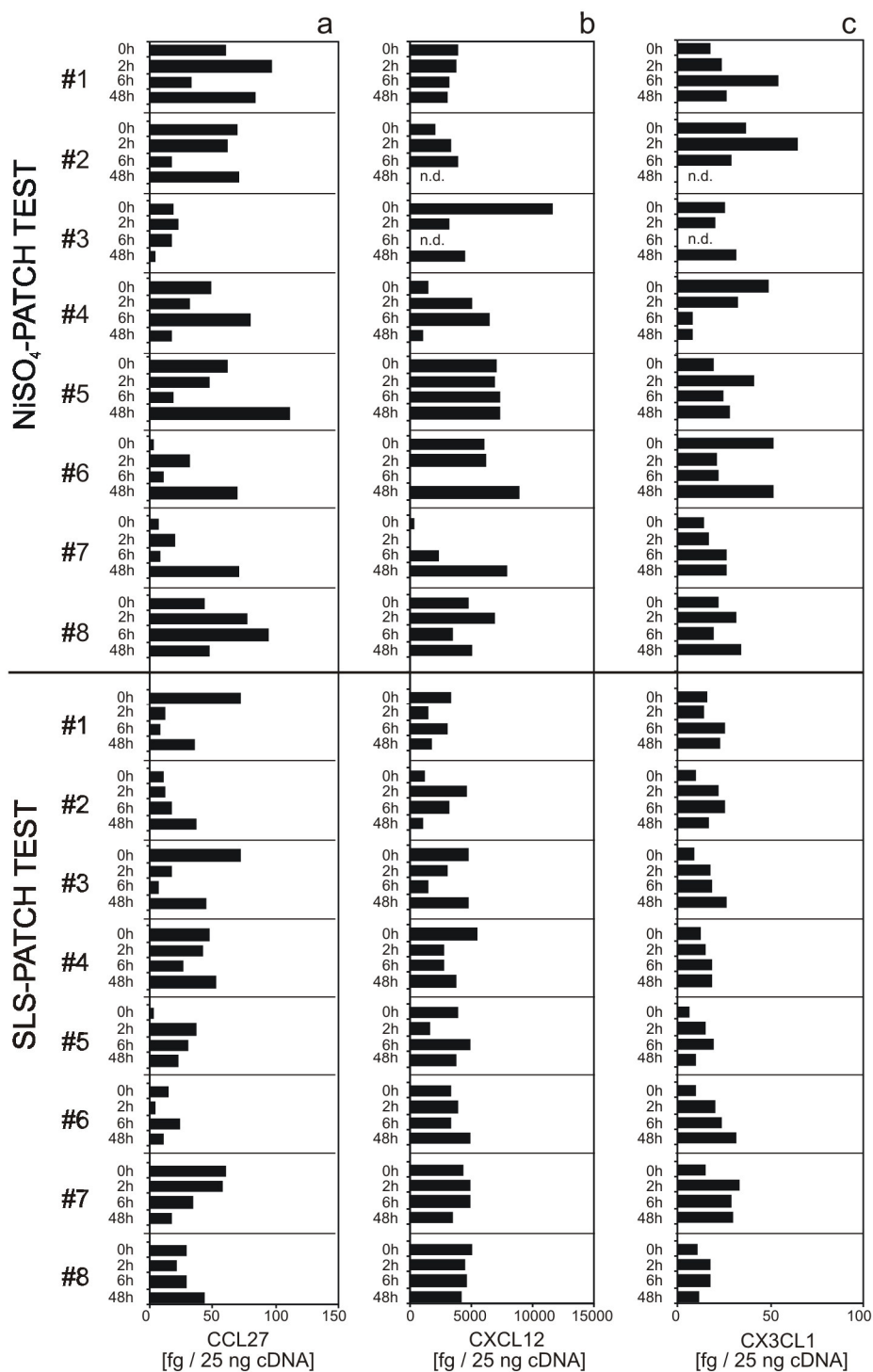


Abbildung 4.8: Homöostatisch regulierte Chemokine. Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der CCL27, CXCL12, CX3CL1 und in Hautproben von humanen Probanden. Als Modell für die allergische Kontaktdermatitis wurde ein NiSO₄-Patch Test in Patienten mit Nickelallergie (n=8) verwendet. Als Modell für die irritative Kontaktdermatitis wurde ebenfalls in Patienten mit Nickelallergie ein SLS-Patch Test verwendet (n=8). Nach 0, 2, 6 und 48 Stunden Chemikalienexposition wurden Hautproben entnommen, die RNA extrahiert und für die Quantitativen Real-Time RT-PCR Analysen verwendet. Die Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzter cDNA dargestellt. n.d., Werte nicht vorhanden.

CCL27/*CTACK*, CXCL12/*SDF-1 α* und CX3CL1/*Fractalkine* waren in allen Patienten homöostatisch reguliert. Sie wurden in gesunder Haut und in Chemikalien-exponierter Haut konstitutiv exprimiert (Abbildung 4.8).

Bei der Analyse der humanen Real-Time (RT)-PCR Ergebnisse mit einem Shrunken Centroid Analyseverfahren zur Ermittlung von differenziell exprimierten Genen, zählten die humanen CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 zu den „Top Ten“ der Gene, die während allergischer und irritativer Hautreaktionen differenziell exprimiert wurden (Abbildung 4.9). CXCL10 steht sogar an erster Stelle. Ebenso zählten CCL7 und CCL13, die deutlich in allergischen Hautreaktionen induzierbar waren, zu den zehn am stärksten differenziell exprimierten Genen (Abbildung 4.9). Betrachtet man sich die zehn am geringsten differenziell exprimierten Gene, so waren 6 davon homöostatisch regulierte Chemokine (CCL21/*6Ckine*, CCL27/*CTACK*, CXCL12/*SDF-1 α* , CXCL14/*BRACK*, XCL1/*Lymphotactin* und CX3CL1/*Fractalkine*). Interessanterweise rangierte CCL22/*MDC*, welches im humanen Modell ebenfalls homöostatisch reguliert wurde, im murinen Modell aber unspezifisch/entzündungsabhängig reguliert war, im Bereich der differentiell exprimierten Gene.

Die Klassifizierung in Allergen/Hapten-spezifisch, unspezifisch/entzündungsabhängig und homöostatisch regulierte Chemokine ist bei den, übereinstimmend im humanen und murinen Modell, untersuchten Chemokinen annähernd identisch (Tabellen 4.1 und 4.3). Hervorzuheben ist, dass die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 im humanen und im murinen Modell Allergen/Hapten-spezifisch reguliert werden. Die 5 in der Maus homöostatisch regulierten Chemokine (CCL21, CCL27, CXCL14, XCL1 und CX3CL1) wurden ebenfalls in den humanen Hautproben homöostatisch reguliert. 7 Chemokine (CCL1, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CCL19 und CCL20) wurden in den murinen und humanen Modellen übereinstimmend unspezifisch/entzündungsabhängig reguliert. Sowohl in Mensch als auch in Maus waren Mitglieder der MCP-Chemokinfamilie (mCCL2, mCCL7, hCCL7 und hCCL13) nicht eindeutig Allergen/Hapten-spezifisch oder unspezifisch reguliert. Die einzigen Unterschiede waren, dass das in der Maus unspezifisch regulierte Chemokin CCL22 im humanen Modell homöostatisch reguliert wurde und das CCL5 im Humanen zu den eindeutig unspezifischen Chemokinen zählte.

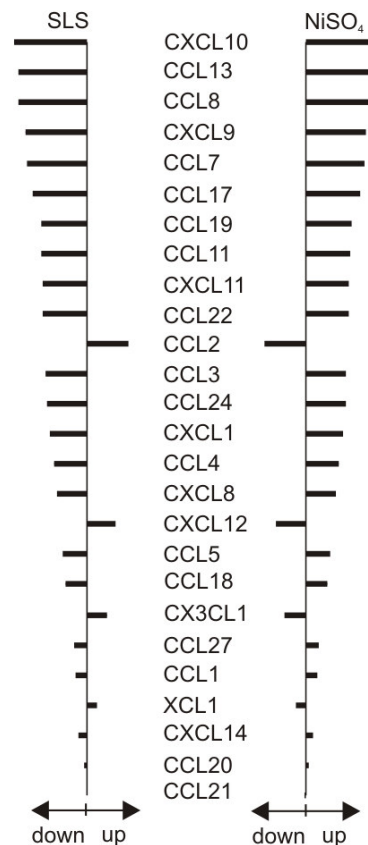


Abbildung 4.9: Shrunken Centroid Analyse der Quantitativen Real-Time (RT)-PCR Ergebnisse im humanen Modell. Es wurde die Chemokinexpression in Hautproben von Patienten nach 48 Stunden NiSO₄-Patch Test mit der Chemokinexpression in Hautproben von Patienten nach 48 Stunden SLS-Patch Test miteinander verglichen.

Beim Vergleich der Induktion der Chemokine in allergischen Hautreaktionen wurde die Übereinstimmung des humanen und des murinen Modells bezüglich ihrer Chemokinexpression verdeutlicht. Dazu wurde die, anhand der Quantitativen Real-Time PCR Analysen ermittelte, Induktion von Chemokinen in humanen NiSO₄-Patch Test Proben (48h NiSO₄-Exposition) mit der Induktion der Chemokine in DNFB-spezifischen Hautentzündungen (24h DNFB-Exposition) in BALB/c Mäusen verglichen. Insgesamt wurden sowohl in den humanen, als auch in den murinen Modellen für allergische Hautreaktionen dieselben Chemokine induziert (Abbildung 4.10).

So zeigen die vergleichenden Analysen der Genexpressionen in Mausmodellen und humanen Modellen für Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis, dass die verwendeten Mausmodelle auf molekularer Ebene eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Hautreaktionen beim Menschen aufweisen.

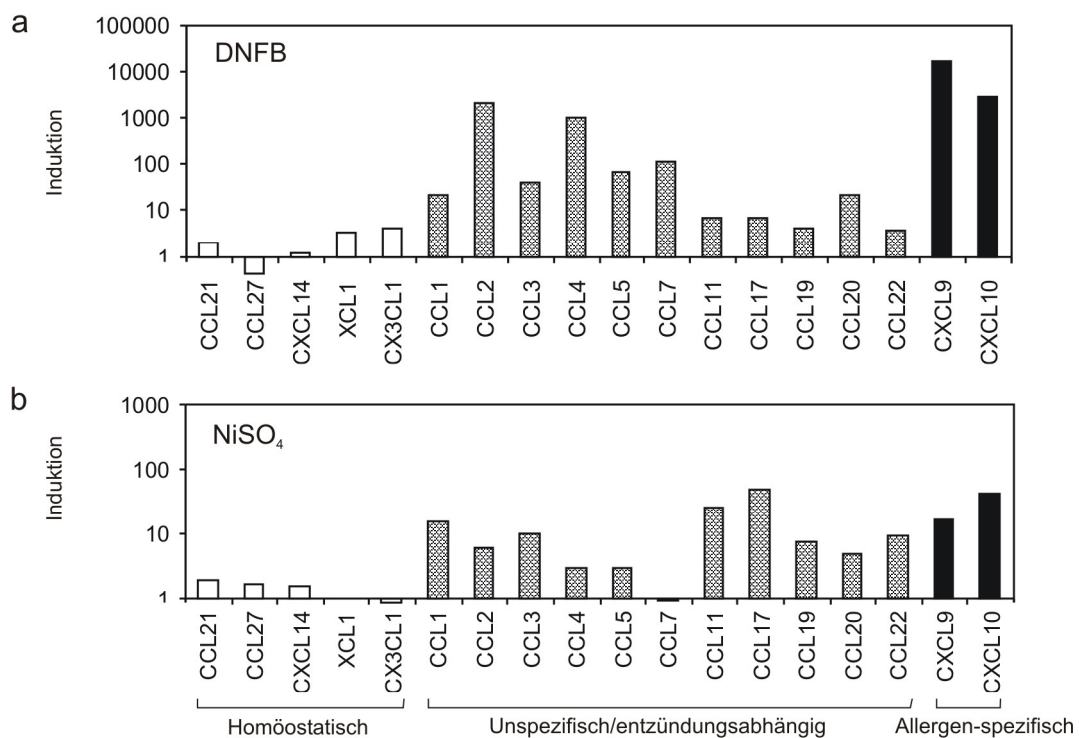


Abbildung 4.10: Vergleich des Chemokinexpressionsprofils von humanen und murinen kontaktallergischen Hautreaktionen. Expression von homöostatischen, unspezifischen/entzündungsabhängig und Allergen-spezifischen Chemokinen im humanen (NiSO₄-Patch-Test) (b) und murinen (DNFB) (a) Modell für Chemikalien-induzierte allergische Kontaktdermatitis. Quantitative Real-Time PCR Ergebnisse sind als Induktion (48h NiSO₄-Patch Test bzw. 24h DNFB-Exposition / 0h NiSO₄-Patch Test bzw. Vehikel-behandelte Kontrolltiere) dargestellt.

4.2.2 Immunhistochemische Analyse

Um die Expression von CXCL9/*MIG* und CXCL10/*IP-10* auf Proteinebene zu untersuchen und den zellulären Ursprung der Chemokinexpression zu identifizieren, sind wie unter 4.2 bereits beschrieben, die von den NiSO₄- und SLS-Patch Test Patienten entnommenen Hautproben immunhistochemisch untersucht worden.

Die immunhistochemischen Analysen bestätigten die mit Quantitativer Real-Time (RT)-PCR erzielten Ergebnisse. CXCL10 wurde in unbehandelter Haut und nach 6 Stunden NiSO₄-Patch Test nicht exprimiert und wurde nach 48 Stunden NiSO₄-Exposition induziert (Abbildung 4.12 a, c, e). In den SLS-Patch Test Patienten war CXCL10 hingegen zu keinem Zeitpunkt induzierbar (Abbildung 4.12 b, d, f). Die Expression des CXCL10-Proteins fand überwiegend in den Keratinozyten der basalen und suprabasalen Schicht der Epidermis statt (Abbildung 4.12 e). In der Dermis war CXCL10 kaum lokalisiert. Es wurde nur von Endothelzellen im superfiziellen Plexus exprimiert.

CXCL9 zeigte in unbehandelter Haut eine konstitutive Expression in dermalen Zellen, die eine dendritische Morphologie aufwiesen (Abbildung 4.11 a, b). Entsprechend der CXCL10 Expression wurde CXCL9 deutlich in der Hapten-induzierten Entzündungsreaktion nach 48 Stunden NiSO₄-Patch Test induziert (Abbildung 4.11 e). Es wurde dabei sowohl in den epidermalen, als auch in den dermalen Kompartimenten der Haut exprimiert. Im Gegensatz zu den Hapten-spezifischen, kontaktallergischen Hautreaktionen fand in den irritativen Hautreaktionen der SLS-behandelten Patienten keine Induktion der CXCL9 Expression statt (Abbildung 4.11 b, d, f).

Im Gegensatz zu den Allergen/Hapten-spezifisch in allergischen Entzündungsreaktionen induzierten CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 repräsentiert CXCL12/*SDF-1α* einen Vertreter der homöostatischen Chemokine. Es wurde in unbehandelter Haut und in den allergischen und irritativen Entzündungsreaktionen konstitutiv in epidermalen und dermalen dendritischen Zellen und in dermalen Endothelzellen exprimiert (Abbildung 4.13). In der immunhistochemischen Lokalisation der Chemokinexpression wurde sichtbar, dass eine Kolo-kalisation von Allergen/Hapten-spezifischen und

homöostatischen Chemokinen in entzündeten Hautarealen während Hapten-induzierten, allergischen Hautreaktionen existierte.

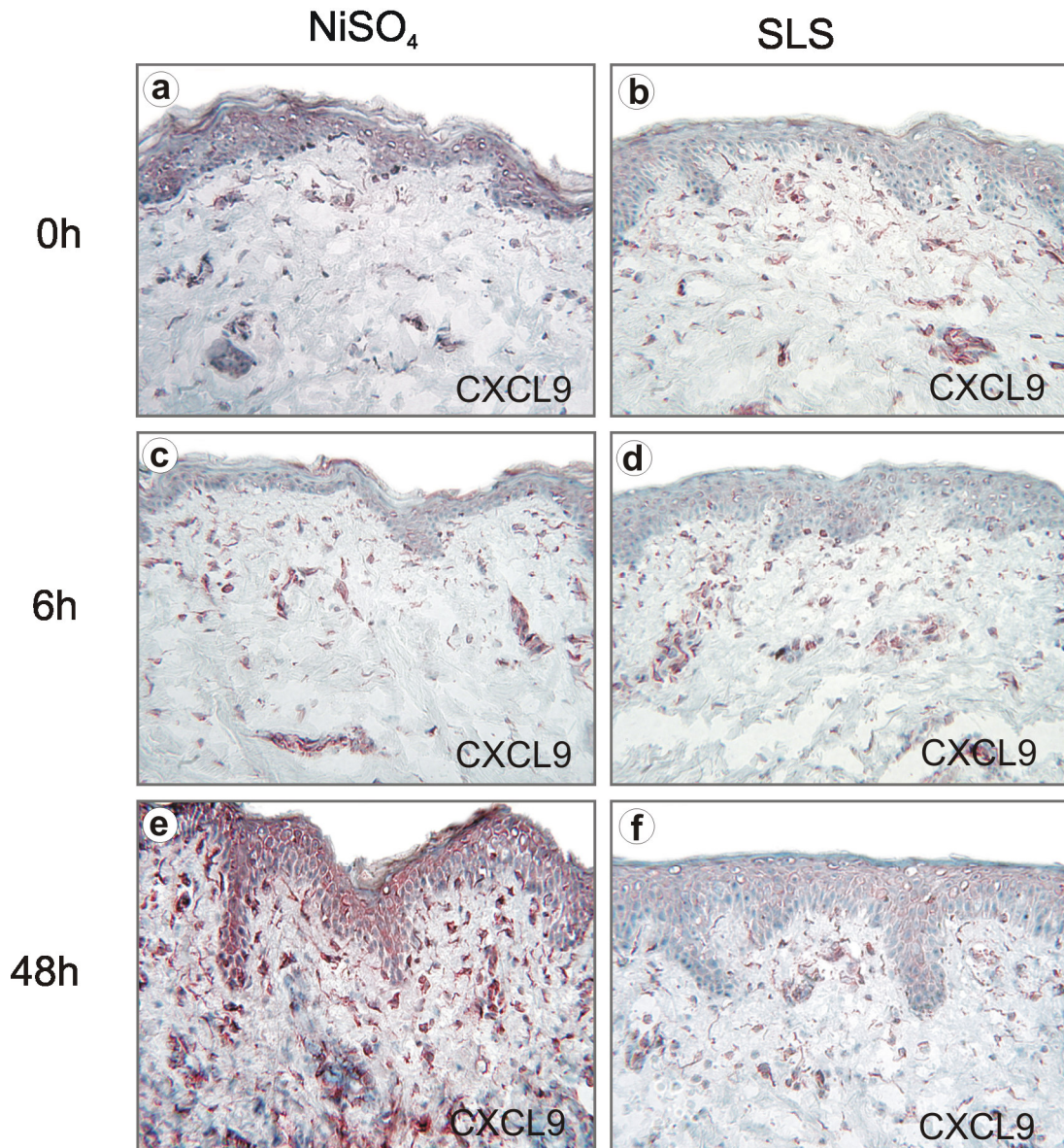


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Untersuchung der CXCL9 Expression in Chemikalien-induzierter allergischer (NiSO_4 -Patch Test) und irritativer (SLS-Patch Test) Kontaktdermatitis. Hautbiopsien wurden 0, 2, 6 und 48 Stunden nach NiSO_4 - oder SLS-Exposition entnommen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von je 8 Patienten. 250-fache Vergrößerung.

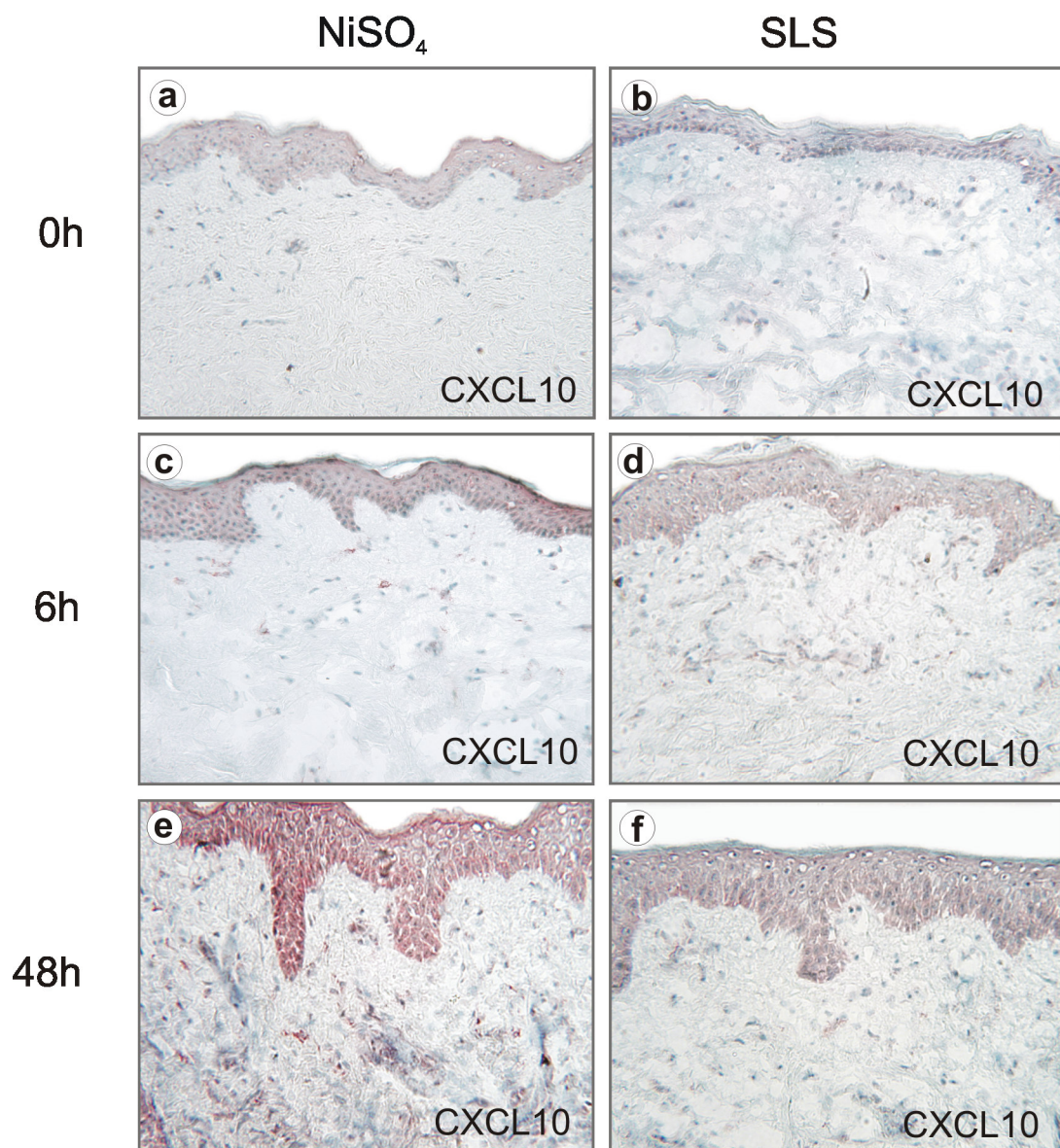


Abbildung 4.12: Immunhistochemische Untersuchung der CXCL10 Expression in Chemikalien-induzierter allergischer (NiSO₄-Patch Test) und irritativer (SLS-Patch Test) Kontaktdermatitis. Hautbiopsien wurden 0, 2, 6 und 48 Stunden nach NiSO₄- oder SLS-Exposition entnommen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von je 8 Patienten. 250-fache Vergrößerung.

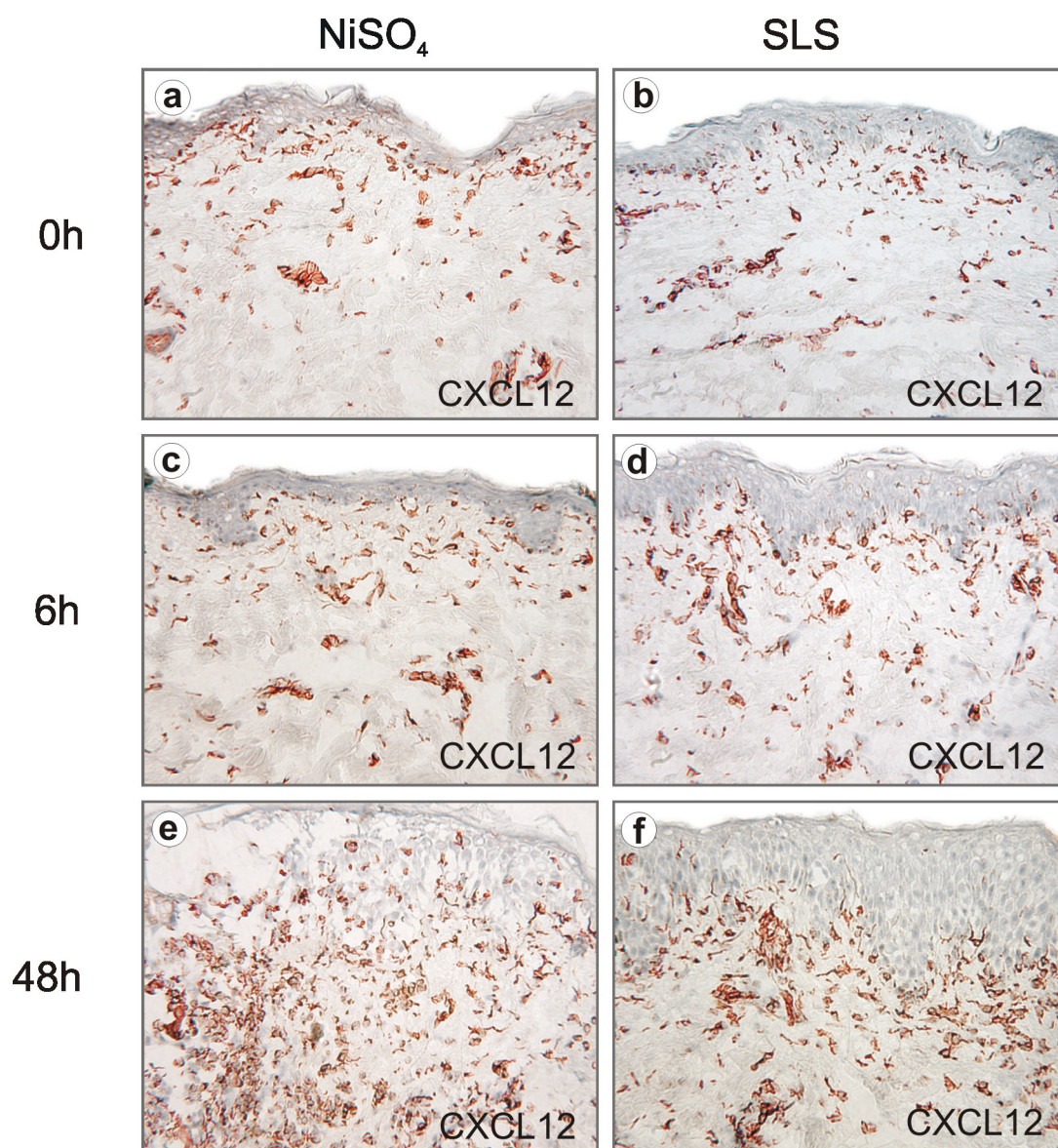


Abbildung 4.13: Immunhistochemische Untersuchung der CXCL12 Expression in Chemikalien-induzierter allergischer (NiSO₄-Patch Test) und irritativer (SLS-Patch Test) Kontaktdermatitis. Hautbiopsien wurden 0, 2, 6 und 48 Stunden nach NiSO₄- oder SLS-Exposition entnommen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von je 8 Patienten. 250-fache Vergrößerung.

4.3 Regulation krankheitsassoziierter Gene

Um eine bessere Einsicht in die Regulationsmechanismen der Allergen/Hapten-spezifischen Chemokine zu bekommen, wurde die CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC Expression in zellulären Konstituenten der Haut untersucht. Dazu wurden humane primäre Keratinozyten, Melanozyten, dermale Fibroblasten und dermale mikrovaskuläre Endothelzellen mit den primären, proinflammatorischen Mediatoren TNF- α /IL-1 β , mit dem von Th1-Zellen produzierten Zytokin IFN- γ oder mit dem von Th2-Zellen produzierten Zytokin IL-4 für 18 Stunden inkubiert und die Chemokinexpression mittels Quantitativer Real-Time (RT)-PCR Analyse untersucht. Die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 wurden fast ausschließlich nach Stimulation der Zellen mit dem Th1-assoziierten Zytokin IFN- γ ausgeprägt (Abbildung 4.14 a-c). Dabei exprimierten Keratinozyten und Endothelzellen die CXCR3-Liganden am stärksten. Neben den Allergen/Hapten-spezifisch regulierten CXCR3-Liganden wurde auch die Regulation des unspezifisch/entzündungsabhängig regulierten Chemokins CCL20/MIP-3 α in den zellulären Konstituenten der Haut untersucht.

Im Kontrast zu CXCL9, CXCL10 und CXCL11 wurde die Expression von CCL20 überwiegend durch die primären, proinflammatorischen Mediatoren TNF- α /IL1 β reguliert, wobei Endothelzellen und dermale Fibroblasten die Hauptproduzenten von CCL20 darstellten (Abbildung 4.14 d).

Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analysen in Dinitrophenyl (DNP)-spezifischen T-Zellklonen zeigten, dass die T-Zellklone nach Antigen-spezifischer Stimulation mit dem Hapten DNP IFN- γ produzierten (Abbildung 4.15 b). Zur Kontrolle wurden die T-Zellen unspezifisch mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Die Produktion von IFN- γ war dabei unabhängig von dem Status der Aktivierung der T-Zellklone, denn die Expression von CD25, einem Zelloberflächenmolekül, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, war in den Antigen-spezifisch und in den unspezifisch stimulierten T-Zellklonen gleich stark (Abbildung 4.15 a).

Die Ergebnisse suggerieren, dass Antigen-spezifisch stimulierte T-Zellen über IFN- γ die Expression von Allergen/Hapten-spezifischen Chemokinen induzieren. Dagegen scheinen unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte

Chemokine, wie das CCL20/*MIP-3 α* durch proinflammatorische Mediatoren induziert zu werden. Die Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen scheint also der Schlüssel für die Differenzierung allergischer und irritativer Hauterkrankungen zu sein.

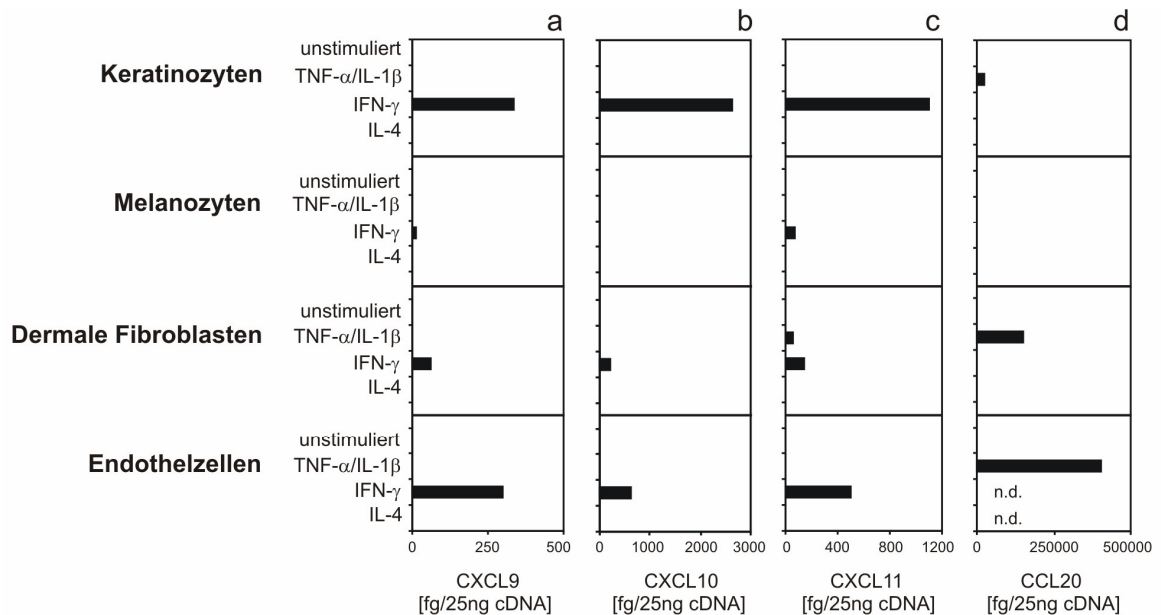


Abbildung 4.14: Regulation krankheitsassoziierter Chemokine. Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analyse der CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CCL20 Expression in zellulären Konstituenten der Haut. Humane primäre Keratinozyten, Melanozyten, dermale Fibroblasten und dermale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit TNF- α /IL1 β , IFN- γ oder IL-4 für 18 Stunden inkubiert und die Chemokinexpression untersucht. Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzt cDNA dargestellt. n.d., Werte nicht vorhanden.

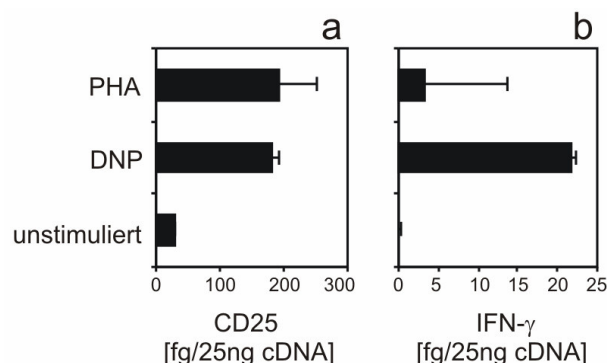


Abbildung 4.15: Hapten-spezifisch stimulierte T-Zellklone produzieren IFN- γ . Quantitative Real-Time (RT)-PCR Analyse der CD25 und IFN- γ mRNA Expression in Dinitrophenyl (DNP)-spezifischen T-Zellklonen. T-Zellklone wurden entweder Antigen-spezifisch mit dem Hapten DNP oder unspezifisch mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. Ergebnisse sind als fg Zielgen pro 25 ng eingesetzt cDNA dargestellt.

4.4 In-vitro-Relevanz krankheitsassoziierter Chemokine

Die Rekrutierung distinkter Leukozytenpopulationen an den Ort der Antigenexposition spielt bei der Initiierung der Kontaktdermatitis eine entscheidende Rolle.

Um die biologische Relevanz der krankheitsassozierten CXCR3-Liganden für die Rekrutierung von T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden Transwell Chemotaxis Experimente durchgeführt. Dazu wurden aus „buffy coat“ Präparaten der örtlichen Blutbank T-Zellen isoliert. In einem Transwellsystem wurden 10^6 T-Zellen in einen Einsatz gegeben, der in eine untere Kammer gehängt wird. Die zu untersuchende Chemokinkonzentration wurde in die untere Kammer gegeben. Der Boden des Einsatzes bestand aus einer mit 3 μm großen Poren durchsetzten Membran, so dass die T-Zellen aktiv in die untere Kammer migrieren konnten. Um die Migration der CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen bestimmen zu können, wurden die migrierten T-Zellen nach einer Migrationszeit von 3 Stunden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels analytischer Durchflußzytometrie die prozentuale Migration der T-Zellpopulationen bestimmt. Alle vier untersuchten T-Zellpopulationen zeigten eine dosisabhängige, aber äußerst geringe chemotaktische Antwort auf verschiedene Konzentrationen CXCL10 (10, 100, 1000 ng/ml) (Abbildung 4.16). Die Migration der CD4+ und CD8+ T-Zellen lag unter 5% (Abbildung 4.16 a, c). Die chemotaktische Antwort der beiden CLA+ T-Zellpopulationen war etwas stärker und lag unter 10% (Abbildung 4.16 b, d). Das „cutaneous lymphocyte associated antigen“ (CLA) wird von Haut infiltrierenden, sog. „skin-homing memory“ T-Zellen gebildet, so dass die CLA+ T-Zellen die T-Zellpopulationen darstellen, die für die Ausbildung von allergischen und irritativen Kontaktdermatitiden am relevantesten sind.

Das homöostatische Chemokin CXCL12/*SDF-1 α* zählt zu den Chemokinen mit der potentesten chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen. Die Migration von CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen auf verschiedenen CXCL12/*SDF-1 α* Konzentrationen verlief in einer Glockenkurve (Abbildung 4.17).

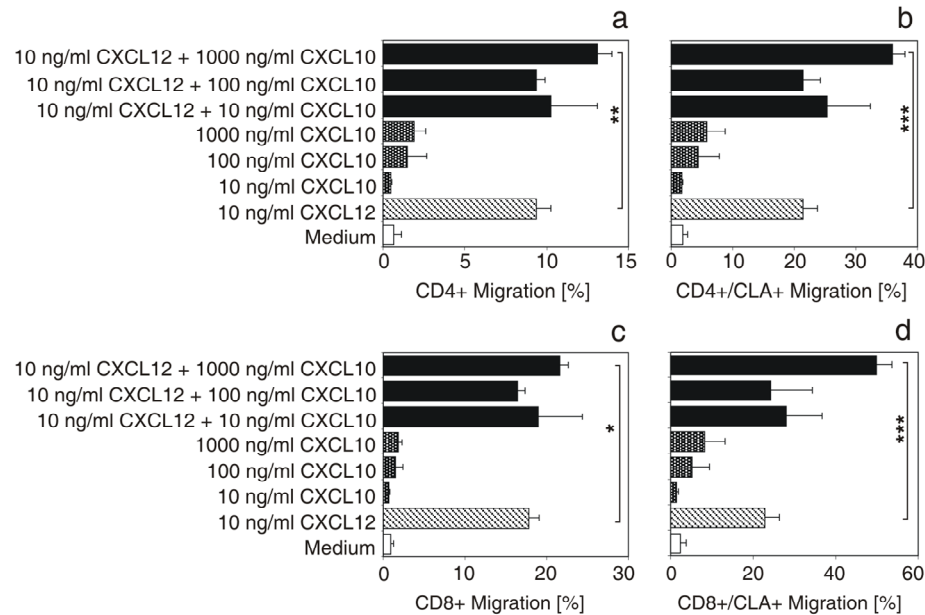


Abbildung 4.16: Das homöostatische Chemokin CXCL12 und das inflammatorische Chemokin CXCL10 kooperieren in der Rekrutierung von CLA+ „skin-homing memory“ T-Zellen. In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+) auf CXCL12 (10 ng/ml) und CXCL10 (10, 100, 1000 ng/ml) alleine und in Kombination untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. *, t-Test, $P < 0,05$; **, t-Test, $P < 0,01$; ***, t-Test, $P < 0,005$. Daten sind repräsentativ für $n=5$ verschiedene Donoren.

Die optimale Konzentration für die Induktion von T-Zellmigration lag bei allen vier T-Zellpopulationen bei 100 ng/ml CXCL12/*SDF1 α* . Bei 10, 500 und 1000 ng/ml CXCL12 war die chemotaktische Antwort der T-Zellen deutlich geringer. Die immunhistochemischen Untersuchungen der Chemokinexpression in allergischen und irritativen Hautreaktionen zeigten, dass CXCL12 mit den CXCR3-Liganden CXCL10 und CXCL9 in allergischen Hautreaktionen kolokalisiert ist (Kapitel 4.2.2). CXCL12 wurde in einer suboptimalen Konzentration von 10 ng/ml mit CXCL10 in verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 1000 ng/ml) kombiniert. Die Kombination von CXCL12 mit 1000 ng/ml CXCL10 zeigte einen signifikanten Anstieg der chemotaktischen Antwort der CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen im Vergleich zur Migration auf CXCL12 alleine (Abbildung 4.16). Dieser Anstieg gegenüber der Migration auf CXCL12 alleine, war bei den CLA+ T-Zellpopulationen besonders markant (t-Test, $P < 0,005$). Dabei migrierten 50% der CD8+CLA+ T-Zellen und

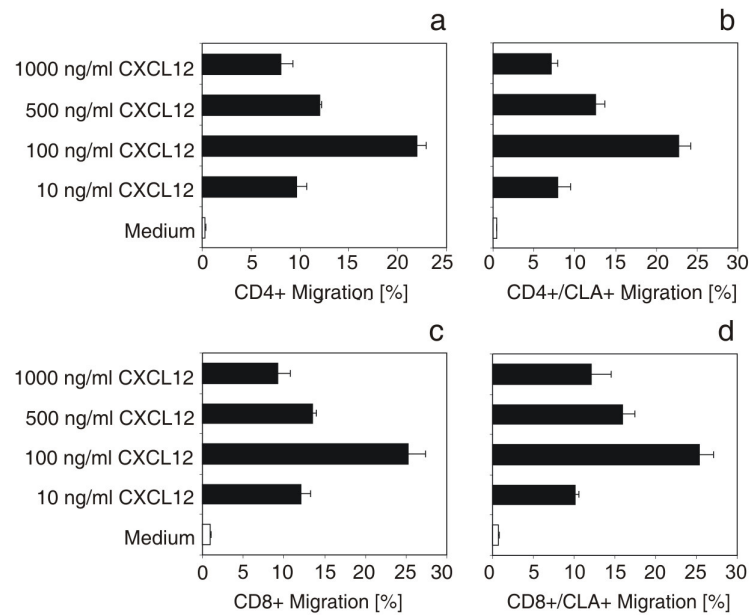


Abbildung 4.17: Das homöostatische Chemokin CXCL12 ist ein potenter Chemoattraktant für T-Zellen. In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+) auf CXCL12 in verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 500, 1000 ng/ml) untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. Daten sind repräsentativ für n=2 verschiedene Donoren.

35% der CD4+CLA+ T-Zellen auf die Kombination von 10 ng/ml CXCL12 mit 1000 ng/ml CXCL10, im Vergleich zu 20 % der CD8+CLA+ und CD4+CLA+ T-Zellen, die auf 10 ng/ml CXCL12 alleine migrierten (Abbildung 4.16 b, d). Die Migration der T-Zellen auf CXCL10 alleine lag unter 10%, so dass es sich hierbei um einen mehr als additiven Effekt handelt und von einer synergistischen Wirkung der beiden Chemokine auf die Migration von CD4+CLA+ und CD8+CLA+ T-Zellen gesprochen werden kann.

Mit CXCL9 wurden Chemotaxisexperimente mit demselben Versuchsaufbau durchgeführt und es konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. CXCL9 alleine induzierte nur sehr geringe chemotaktische Antworten in den CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen (Abbildung 4.18). Die Migration war dabei dosisabhängig und lag für die einzelnen T-Zellpopulationen in denselben Größenordnungen, wie die Migration auf CXCL10. Eine suboptimale Konzentration von CXCL12 (10 ng/ml) induzierte in Kombination mit 1000 ng/ml CXCL9 auch einen signifikanten Anstieg der Migration der vier

T-Zellpopulationen (t-Test, $P < 0,05$), wobei CXCL12 und CXCL9 ebenfalls eine synergistische Wirkung auf die Migration der CLA⁺ T-Zellpopulationen hatten (Abbildung 4.18 b, d). So migrierten 30% der CD4⁺CLA⁺ und CD8⁺CLA⁺ T-Zellen auf die Kombination von CXCL12 mit 1000 ng/ml CXCL10. Die Ergebnisse demonstrierten, dass das homöostatische Chemokin CXCL12 mit den inflammatorischen Chemokinen CXCL10 und CXCL9 in der Rekrutierung von CD4⁺CLA⁺ und CD8⁺CLA⁺ „skin-homing memory“ T-Zellen kooperierte.

Kombiniert man dagegen CXCL12 mit einem anderen homöostatischen Chemokin, dem Haut-spezifischen CCL27/CTACK, war keine synergistische Wirkung der beiden Chemokine auf die migratorische Antwort der CD4⁺, CD4⁺CLA⁺, CD8⁺ und CD8⁺CLA⁺ T-Zellpopulationen sichtbar (Abbildung 4.19).

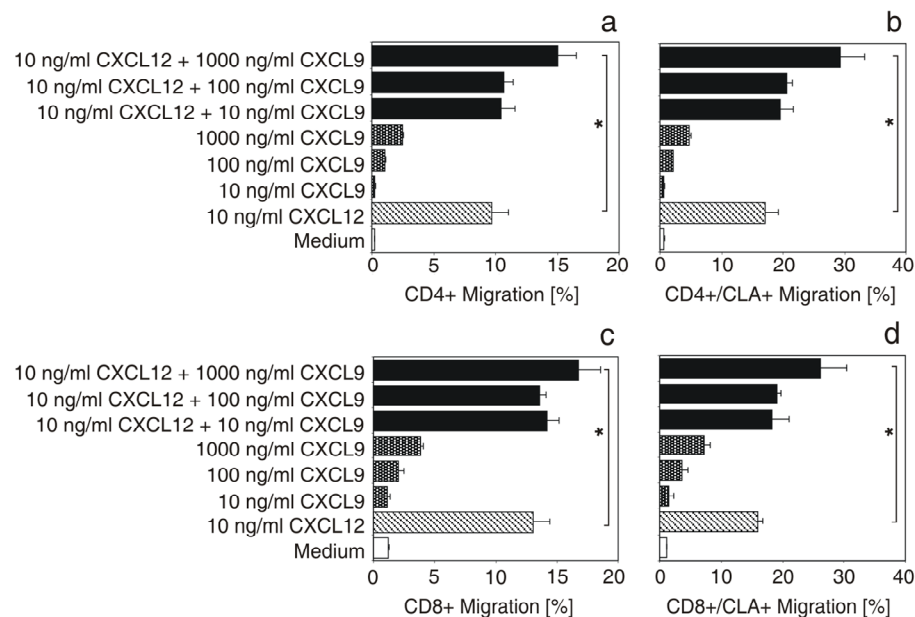


Abbildung 4.18: Das homöostatische Chemokin CXCL12 und das inflammatorische Chemokin CXCL9 kooperieren in der Rekrutierung von CLA⁺ „skin-homing memory“ T-Zellen. In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4⁺, CD4⁺CLA⁺, CD8⁺ und CD8⁺CLA⁺) auf CXCL12 (10 ng/ml) und CXCL9 (10, 100, 1000 ng/ml) alleine und in Kombination untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. *, t-Test, $P < 0,05$. Daten sind repräsentativ für n=6 verschiedene Donoren.

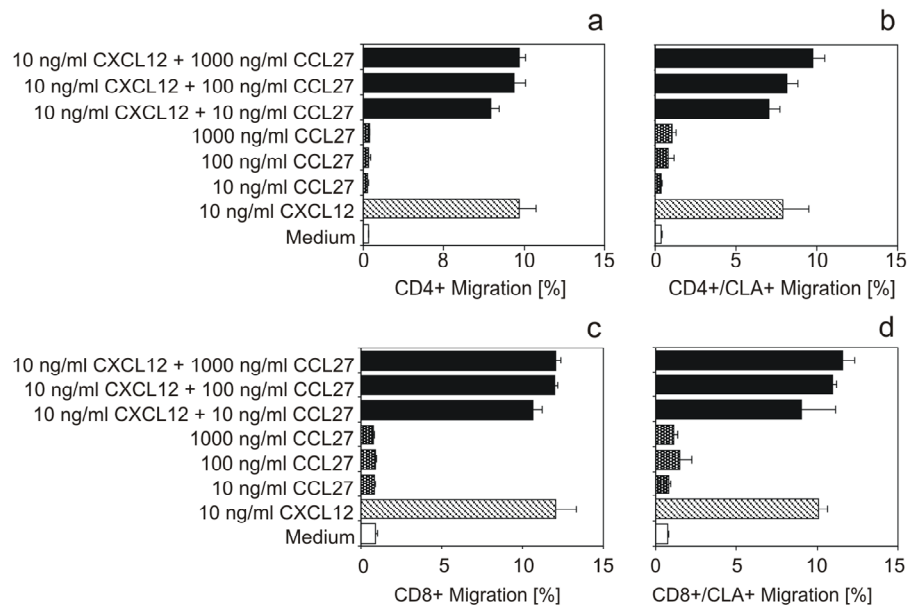


Abbildung 4.19: Die beiden homöostatischen Chemokine CXCL12 und CCL27 kooperieren nicht in der Rekrutierung von CLA+ „skin-homing memory“ T-Zellen. In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4+, CD4+/CLA+, CD8+ und CD8+/CLA+) auf CXCL12 (10 ng/ml) und CCL27 (10, 100, 1000 ng/ml) alleine und in Kombination untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. Daten sind repräsentativ für n=3 verschiedene Donoren.

In Experimenten mit Pertussistoxin (PTX) konnte gezeigt werden, dass die synergistische Wirkung von CXCL12 und CXCL10 durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren vermittelt wird. Die Präinkubation der T-Zellen mit dem G-Proteininhibitor PTX, blockierte die Migration der CD4+, CD4+CLA+, CD8+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen auf die Kombination von 10 ng/ml CXCL12 mit 1000 ng/ml CXCL10 (Abbildung 4.20).

Weitere Untersuchungen verdeutlichten, dass es sich bei dem Synergismus von CXCL12 und CXCL10 um einen, durch das inflammatorische Chemokin vermittelten „Priming“-Effekt handelt. Die Präinkubation der T-Zellen mit 1000 ng/ml CXCL10 und eine anschließende Migration auf 10 ng/ml CXCL12 reproduzierte die synergistische Wirkung der beiden Chemokine auf das Migrationsverhalten der CD4+CLA+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen (Abbildung 4.21). Umgekehrt induzierte die Präinkubation mit 10 ng/ml CXCL12

und anschließende Migration der T-Zellen auf CXCL10 keinen Anstieg der Migration. Die Ergebnisse suggerieren, dass inflammatorische Chemokine, wie die CXCR3-Liganden, die zu den Orten der Entzündung infiltrierenden Lymphozyten für die konstitutiv in der Haut exprimierten, homöostatischen Chemokine „sensibilisieren/primen“, wodurch die Rekrutierung von Lymphozyten amplifiziert wird.

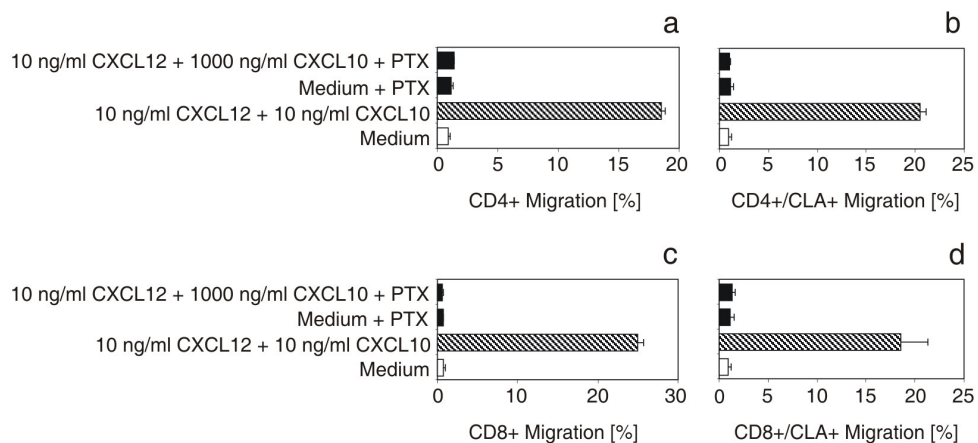


Abbildung 4.20: Der synergistische Effekt von CXCL12 und CXCL10 ist Pertussistoxin (PTX) sensitiv. In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4+, CD4+/CLA+, CD8+ und CD8+/CLA+) auf die Kombination von CXCL12 (10 ng/ml) mit CXCL10 (1000 ng/ml), mit und ohne Vorinkubation der Zellen mit PTX, untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. Daten sind repräsentativ für n=2 verschiedene Donoren.

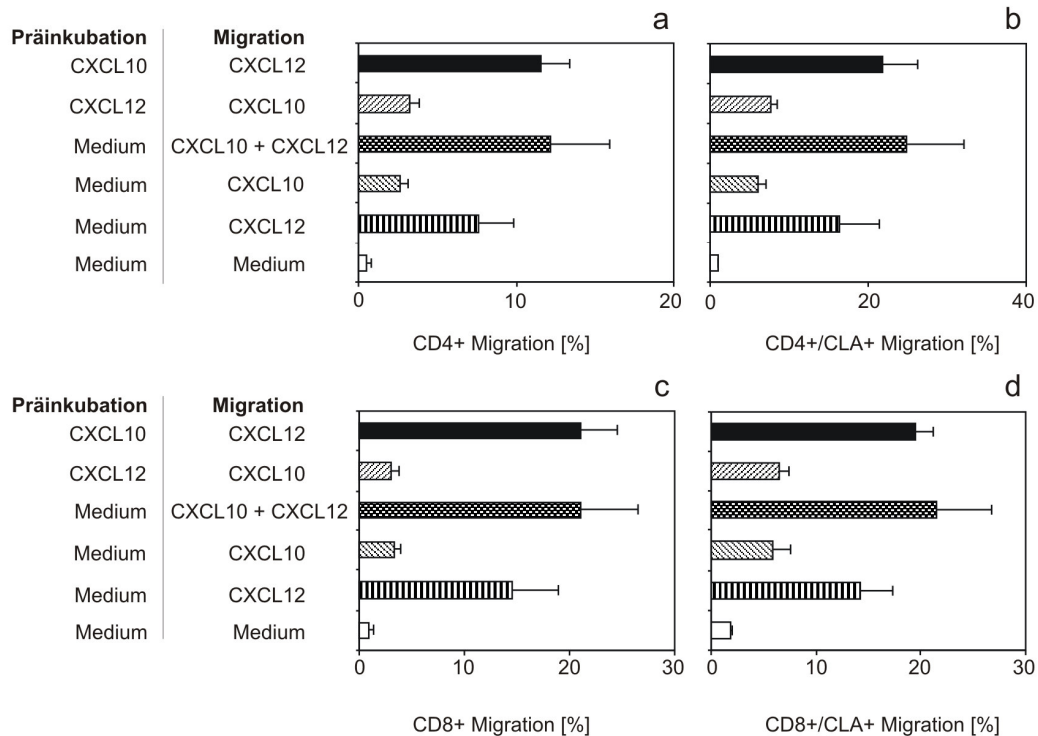


Abbildung 4.21: Der Synergismus von CXCL12 und CXCL10 in der Rekrutierung von CLA+ „skin-homing memory“ T-Zellen basiert auf einem „Priming“-Effekt.

In Transwell Chemotaxis Experimenten wurde die Migration von verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4+, CD4+/CLA+, CD8+ und CD8+/CLA+) auf CXCL12 (10 ng/ml) und CXCL10 (1000 ng/ml) alleine und in Kombination untersucht. Die T-Zellen wurden vor dem Chemotaxis Experiment mit Medium, CXCL12 (10 ng/ml) oder CXCL10 (1000 ng/ml) vorinkubiert („Priming“). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte plus Standardabweichungen des relativen Anteils wandernder Zellen (%) im Vergleich zur Startpopulation dargestellt. Daten sind repräsentativ für n=2 verschiedene Donoren.

4.6 In-vivo-Relevanz krankheitsassoziiierter Chemokine.

In Adoptivtransferexperimenten wurde die Fragestellung untersucht, ob die in den *in-vitro* Experimenten gewonnene Erkenntnis, dass das mit Chemikalien-induzierter allergischer Kontaktdermatitis assoziierte Chemokin CXCL10 durch einen „Priming“-Effekt eine erhöhte Migration von Lymphozyten induziert auch auf ein *in-vivo* System übertragbar ist. Dazu wurden BALB/c Mäuse am Tag 0 mit dem Kontaktallergen Dinitrofluorobenzol (DNFB) (0,5%) an beiden Ohren sensibilisiert. Am Tag 6-10 wurden die Tiere getötet, die aurikulären Lymphknoten und die Milzen entnommen, die Organe gepoolt und

Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden dann mit 1000 ng/ml CXCL10 (Stimulation) oder Medium (unstimuliert) inkubiert und 5×10^7 bis 1×10^8 Zellen wurden naiven Rezipientenmäusen injiziert. Die Rezipienten sind $\frac{1}{2}$ Stunde vor der Injektion mit 0,25% DNFB, mit der Konzentration, die im Kontaktallergiemodell zur Auslösung einer allergischen Zweitantwort benutzt wird, an beiden Ohren behandelt worden. Vor und 24, 48 und 72 Stunden nach dem Zelltransfer erfolgte die Messung der Ohrdicke. In sensibilisierten Mäusen werden Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen gebildet, die überwiegend in den Milzen und Lymphknoten der Tiere lokalisiert sind und im Adoptivtransfer auf unsensibilisierte Rezipienten übertragen werden. In den Rezipienten soll dann durch die Behandlung mit der Allergendosis zur Auslösung einer Zweitreaktion eine leichte allergische Hautreaktion induzierbar sein.

Es sind vier Adoptivtransferexperimente mit je mindestens fünf Mäusen pro Gruppe (CXCL10-stimuliert, unstimuliert) durchgeführt worden. Die Betrachtung der Ohrschwellungen der einzelnen Rezipienten aller vier Experimente zeigte, dass die Rezipienten nach Transfer von CXCL10-stimulierten Zellen höhere Ohrschwellungen aufwiesen, als die Rezipienten nach dem Transfer unstimulierter Zellen (Abbildung 4.22).

Beim Vergleich der Mittelwerte der Ohrschwellungen aller Rezipienten der beiden Gruppen (CXCL10-stimuliert vs. unstimuliert) wurde deutlich, dass die Ohrschwellung in den mit CXCL10-stimulierten Zellen behandelten Tieren 24 und 48 Stunden nach Auslösen einer allergischen Zweitantwort signifikant (t-Test, $P < 0,005$) höher war als in den mit unstimulierten Zellen behandelten Tieren (Abbildung 4.23). Als Kontrolle wurden naive Mäuse nur mit 0,25% DNFB behandelt, ohne Injektion von Zellen.

Im Hinblick auf die untersuchte Fragestellung scheint sich zu bestätigen, dass CXCL10 die transferierten Zellen stimuliert, so dass diese vermehrt zu den Orten der Hapten-(DNFB)-Exposition gelangen. Es ist anzunehmen, dass hier derselbe „Priming“-Effekt, der in den *in-vitro* Chemotaxisexperimenten beobachtet wurde, zugrunde lag.

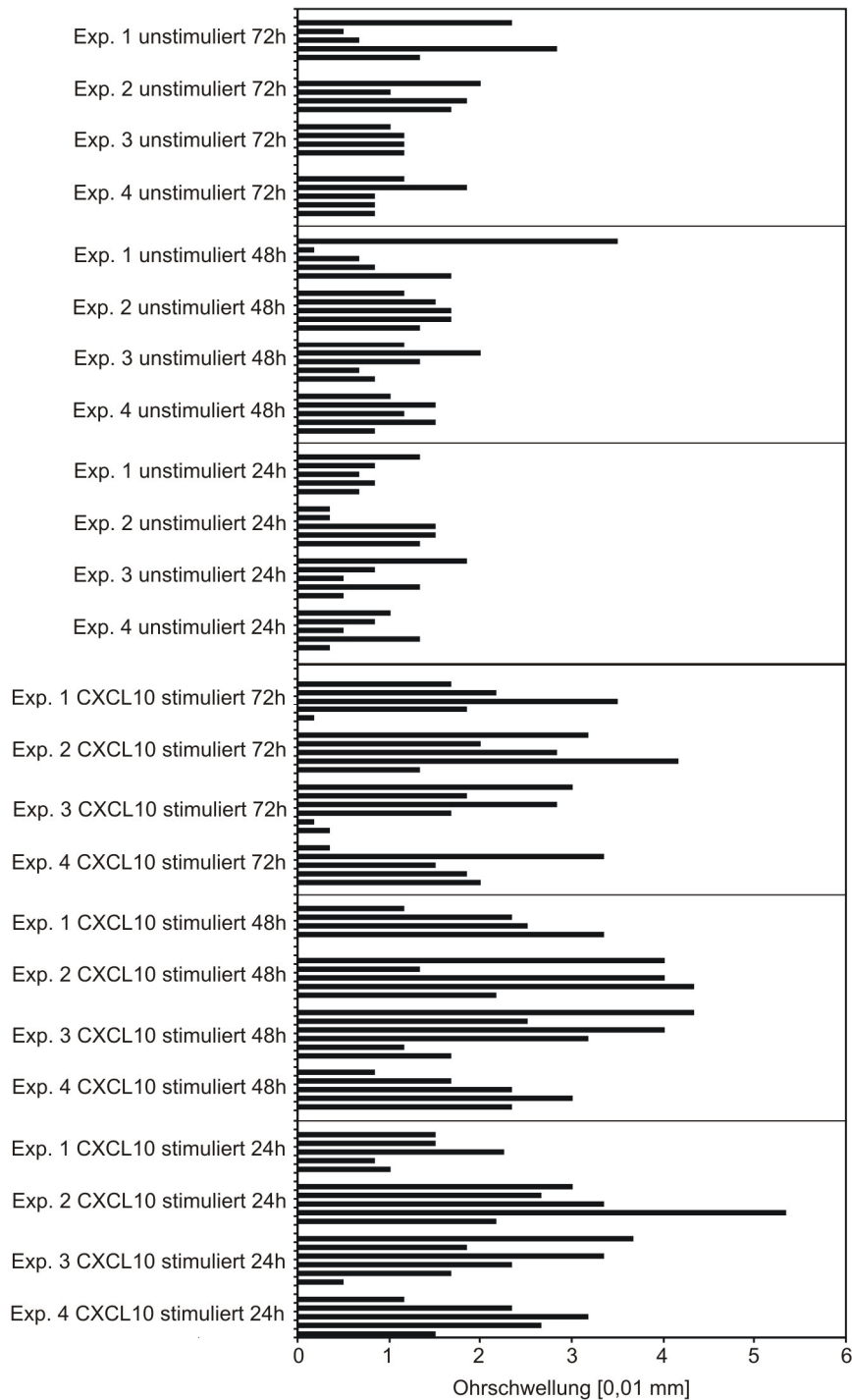


Abbildung 4.22: Adoptivtransferexperimente in BALB/c Mäusen. BALB/c Mäuse wurden am Tag 0 mit 0,5% Dinitrofluorobenzol (DNFB) sensibilisiert. Am Tag 6-10 wurden die Tiere getötet, die Milz und die aurikulären Lymphknoten entnommen, die Organe gepoolt und daraus Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden entweder mit 1000 ng/ml CXCL10 stimuliert oder unstimuliert in naive Rezipientenmäuse injiziert. ½ Stunde vor der Injektion wurden die naiven Mäuse mit der im Kontaktallergiemodell zur Auslösung einer allergischen Zweitantwort verwendeten Dosis von 0,25% DNFB an den Ohren behandelt. Die Messung der Ohrdicke erfolgte vor dem Auslösen der Zweitantwort und 24, 48 und 72 Stunden danach. Dargestellt sind die Ohrschwellungen der Einzeltiere in 4 verschiedenen Experimenten in 0,01 mm.

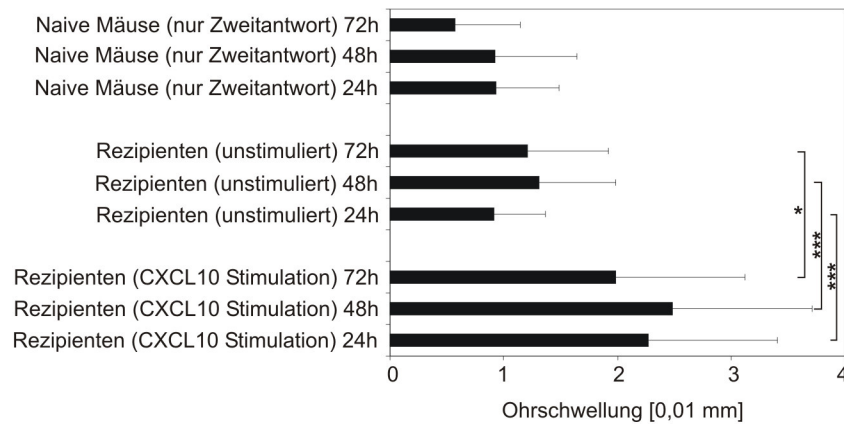


Abbildung 4.23: Die CXCL10-Stimulation von transferierten Zellen erhöht die Ohrschwellung in Rezipientenmäusen in Adoptivtransferexperimenten. BALB/c Mäuse wurden am Tag 0 mit 0,5% Dinitrofluorobenzol (DNFB) sensibilisiert. Am Tag 6-10 wurden die Tiere getötet, die Milz und die aurikulären Lymphknoten entnommen, die Organe gepoolt und daraus Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden entweder mit 1000 ng/ml CXCL10 stimuliert oder unstimuliert in naive Rezipientenmäuse injiziert. ½ Stunde vor der Injektion wurden die naiven Mäuse mit der im Kontaktallergiemo- dell zur Auslösung einer allergischen Zweitantwort verwendeten Dosis von 0,25% DNFB an den Ohren behandelt. Als Kontrolle wurden naive Mäuse nur mit 0,25% DNFB an den Ohren behandelt. Die Messung der Ohrdicke erfolgte vor dem Auslösen der Zweitantwort und 24, 48 und 72 Stunden danach. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardabweichungen der Ohrschwellungen von den Rezipienten nach Injektion von CXCL10 stimulierten Zellen (n=21) und von den Rezipienten nach Injektion von unstimulierten Zellen (n=20) aus 4 verschiedenen Experimenten. Ebenfalls sind die Mittelwerte plus Standardabweichungen der Ohrschwellungen der Kontrollmäuse (nur Zweitantwort) (n=31) aus 6 verschiedenen Experimenten dargestellt. *, t-Test, $P < 0,05$; ***, t-Test, $P < 0,005$.

5. Diskussion

In den letzten Jahren weisen Studien vermehrt darauf hin, dass hautinfiltrierenden T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Chronifizierung von entzündlichen Hauterkrankungen, wie der Chemikalien-induzierten allergischen und irritativen Kontaktdermatitis zukommt (Brasch *et al.*, 1992; Sinigaglia, 1994). Chemokine vermitteln zusammen mit Adhäsionsmolekülen die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, steuern die Wanderung von Leukozyten durch Endothelien und durch extrazelluläre Matrix und regulieren die Lokalisierung bestimmter Leukozytenpopulationen in peripheren Geweben (Homey *et al.*, 1999; Zlotnik *et al.*, 2000). Somit ist anzunehmen, dass Chemokine die Rekrutierung von pathogenetisch relevanten Leukozytenpopulationen in die Haut steuern.

5.1 Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis zeigen spezifische und distinkte Chemokinexpressionsprofile.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende Analyse der Chemokinexpressionsprofile in murinen und humanen Modellen für Chemikalien-induzierte allergische oder irritative Hautreaktionen durchgeführt und Unterschiede zwischen den beiden Formen der Kontaktdermatitis herausgearbeitet.

Dabei konnten fünf homöostatisch regulierte Chemokine (CCL21/6Ckine, CCL27/CTACK, CXCL14/BRAK, XCL1/Lymphotactin und CX3CL1/Fractalkine), die konstitutiv in der Haut exprimiert wurden, identifiziert werden (Tabelle 4.1). neun Chemokine (CCL1/I-309, CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL10/MIP-1 γ , CCL11/Eotaxin, CCL17/TARC, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α und CCL22/MDC) folgten einem unspezifischen Regulationsmuster, indem sie entzündungsabhängig sowohl in den irritativen, als auch in den allergischen Hautreaktionen ausgeprägt wurden. Daneben konnten zwei Chemokine (CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10) identifiziert werden, die Allergen/Hapten-spezifisch ausschließlich in den allergischen Reaktionen induziert wurden.

Die Zuordnung von drei Chemokinen (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , und CCL5/RANTES) als unspezifisch/entzündungsabhängig oder Allergen/Hapten-spezifisch war nicht eindeutig (Abbildung 4.3). CCL2, CCL3 und CCL5 wurden zwar sehr dominant in den allergischen Hautreaktionen induziert, allerdings nicht ausschließlich. In den Crotonöl-induzierten oder in den durch 0,5% DNFB (irritative Dosis des Haptens) induzierten, irritativen Hautreaktionen war ebenfalls eine leichte Induktion dieser Chemokine festzustellen.

Das verwendete Mausmodell ist ein häufig verwendetes Standardmodell für die Induktion von kontaktallergischen und -irritativen Hautreaktionen in Mäusen (Gutwald *et al.*, 1991; Kondo *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1996; Homey *et al.*, 2002; Scholzen *et al.*, 2003). Die Messung der Ohrschwellungen zeigte, dass die Entzündungsreaktionen in den DNFB- und in den Crotonöl-behandelten Tieren gleich stark verlaufen (Abbildung 4.1). Die dargestellten Unterschiede in der Chemokinexpression zwischen allergischer und irritativer Kontaktdermatitis waren also unabhängig von der Entzündungsstärke der Hautreaktionen. Außerdem verdeutlicht die Messung der Ohrschwellung, dass die Hautreaktionen der Mäuse in einer charakteristischen Art und Weise verlaufen. Für DNFB-induzierte allergische Hautreaktionen in BALB/c Mäusen ist bekannt, dass die maximal Ohrschwellung typischer Weise nach 24 Stunden DNFB-Exposition erreicht wird, wohingegen eine Crotonöl-induzierte irritative Hautreaktion bereits nach 4 bis 12 Stunden ihre maximale Entzündungsstärke erlangt (Kondo *et al.*, 1994; Scholzen *et al.*, 2003).

Analog zu den Untersuchungen im Mausmodell konnten auch in humanen Modellen für Chemikalien-induzierte allergische und irritative Kontaktdermatitis Unterschiede in der Chemokinexpression in allergischen und irritativen Hautreaktionen ermittelt werden. Es wurden drei Allergen/Hapten-spezifische Chemokine (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC) identifiziert, die ausschließlich in den allergischen Reaktionen induziert wurden. Sieben Chemokine (CCL21/6Ckine, CCL22/MDC, CCL27/CTACK, CXCL12/SDF-1 α , CXCL14/BRAK, XCL1/Lymphotactin, XC3CL1/Fractalkine) wurden homöostatisch, konstitutiv in der Haut exprimiert. Daneben wurden 14 Chemokine (CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL17/TARC, CCL18/DC-CK1,

CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL24/Eotaxin-2, CXCL1/Gro-1 und CXCL8/IL-8) unspezifisch/entzündungsabhängig in den allergischen und in den irritativen Hautreaktionen induziert. Ebenso, wie in den Mausmodellen wurden Chemokine (CCL7/MCP-3 und CCL13/MCP-4) identifiziert, deren eindeutige Zuordnung als unspezifisch/entzündungsabhängig oder Allergen/Hapten-spezifisch reguliert schwierig war. Auf den ersten Blick wirkten CCL7 und CCL13 Allergen/Hapten-spezifisch reguliert, da sie, im Vergleich zu den allergischen Reaktionen, in den irritativen Hautreaktionen kaum ausgeprägt wurden (Abbildung 4.7). Auch die eindeutig Allergen/Hapten-spezifisch regulierten Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 wurden teilweise in den SLS-induzierten, irritativen Hautreaktionen sehr schwach ausgeprägt. Vergleicht man dies allerdings mit CCL7 und CCL13, so fällt auf, dass die Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 keinem zeitlichen Muster folgt. Vor allem CXCL11 scheint in den SLS-Patch Test Patienten in geringem Maße konstitutiv exprimiert zu werden, denn es war auch in gesunder Haut (0 Stunden SLS-Patch Test) nachweisbar. CCL7 und CCL13 waren dagegen in den SLS-induzierten, irritativen Hautreaktionen nach 48 Stunden induzierbar. Deshalb muss hier wohl eher von einem unspezifischen/entzündungsabhängigen Regulationsmuster gesprochen werden.

Besonders hervorzuheben ist, dass die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 übereinstimmend in murinen und humanen Modellen für Chemikalien-induzierte Kontaktdermatitis in den allergischen Hautreaktionen exprimiert wurden, nicht aber in den irritativen Hautreaktionen (Abbildung 4.1 und 4.5). Untersuchungen von Flier *et al.* bestätigen auch mit *in situ* Hybridisierung, dass CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in humanen Nickel-Patch Test Biopsien, nicht aber in SLS-Patch Test Biopsien nachzuweisen sind (Flier *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings die differenzielle Expression der CXCR3-Liganden in allergischen und irritativen Hautreaktionen erstmals quantitativ nachgewiesen werden und wurde in immunhistochemischen Analysen auf Proteinebene bestätigt (Abbildung 4.11 und 4.12). Dabei konnte auch der zelluläre Ursprung der Chemokinexpression identifiziert werden. CXCL9 wurde sowohl in dermalen, als auch in epidermalen Kompartimenten der Haut nachgewiesen. CXCL10 wurde fast ausschließlich von epidermalen Keratinozyten exprimiert. Dies wird durch *in situ* Hybridisierungen von Flier *et al.* bestätigt, in denen

ebenfalls nachweisbar war, dass CXCL10 in Nickel-Patch Test Reaktionen überwiegend von Keratinozyten in der Epidermis gebildet wurde, wohingegen die CXCL9 Expression mehr in der Dermis lokalisiert war (Flier *et al.*, 2001).

Die durchgeführte Shrunken Centroid Analyse zur Ermittlung von differenziell exprimierten Genen unterstrich die unterscheidenden Eigenschaften der CXCR3-Liganden, da CXCL9, CXCL10 und CXCL11 zu den zehn am stärksten differenziell exprimierten Genen zählten (Abbildung 4.9). Die homöostatisch regulierten Chemokine rangierten dagegen bei den zehn am geringsten differenziell exprimierten Genen, ebenso das unspezifisch/entzündungsabhängig regulierte Chemokin CCL20/*MIP-3 α* (Abbildung 4.9).

Insgesamt zeigten die Quantitativen Real-Time (RT)-PCR Ergebnisse und die immunhistochemischen Befunde dieser Arbeit, dass die CXCR3-Liganden Kandidaten für die Differenzierung zwischen allergischen und irritativen Hauterkrankungen darstellen. Die nachfolgenden Untersuchungen dieser Arbeit wurden deswegen auf die CXCR3-Liganden gerichtet.

5.2 Mausmodelle sind auf der molekularen Ebene repräsentativ für allergische und irritative Reaktionen im Menschen.

Aufgrund der großen Übereinstimmungen im Chemokinexpressionsprofil von Maus und Mensch, stellte sich das murine Modell als ein valides Modell für Chemikalien-induzierte allergische und irritative Hautreaktionen im Menschen heraus. Die fünf in der Maus homöostatisch regulierten Chemokine (CCL21, CCL27, CXCL14, XCL1 und CX3CL1) wurden ebenfalls in den humanen Hautproben homöostatisch reguliert. Sieben Chemokine (CCL1, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CCL19 und CCL20) wurden in den murinen und humanen Modellen übereinstimmend unspezifisch/entzündungsabhängig reguliert (Tablle 4.1 und 4.3). Sowohl in Mensch, als auch in Maus waren Mitglieder der MCP-Chemokinfamilie (mCCL2, mCCL7, hCCL7 und hCCL13) nicht eindeutig Allergen/Hapten-spezifisch oder unspezifisch/entzündungsabhängig reguliert. Die Gene von CCL2/*MCP-1*, CCL7/*MCP-3*, CCL8/*MCP-2* und CCL13/*MCP-4* sind auf dem selben Chromosom lokalisiert (Rollins *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 2001) und die MCP-Chemokine weisen große Homologien zueinander auf, so

dass nicht ganz eindeutig ist, ob das murine CCL7 auch dem humanen CCL7 entspricht, oder einem anderen humanen Liganden der MCP-Familie. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die CCL7 Expression in den humanen und murinen Modellen für Chemikalien-induzierte Kontaktdermatitis sehr ähnlich war.

CCL22/MDC wurde in der Maus unspezifisch reguliert und wurde im humanen Modell als homöostatisch reguliert eingeordnet (Tabelle 4.1 und 4.3). Laut der Shrunken Centroid Analyse der humanen Quantitativen Real-Time Ergebnisse zählte CCL22 zu den differenziell in allergischen und irritativen Hautreaktionen exprimierten Genen. Dies spricht eher für die in der Maus vorgenommene Einteilung als unspezifisch/entzündungsabhängiges reguliertes Chemokin.

5.3 Die CXCR3-Liganden CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC sind IFN- γ induzierbare Chemokine.

CXCL9 und CXCL10 gehören zu den ersten Chemokinen, die in Mensch und Maus identifiziert wurden (Luster *et al.*, 1985; Ohmori *et al.*, 1990; Vanguri *et al.*, 1990; Farber, 1993). Die Identifizierung des humanen CXCL11 erfolgte etwas später (Cole *et al.*, 1998; Tensen *et al.*, 1999). Das murine CXCL11 blieb längere Zeit unentdeckt. Erst 2000 schlussfolgerten Widney *et al.* aus ihren Untersuchungen eines neuentdeckten murinen Chemokins, dass es sich bei diesem um das murine Gegenstück zu dem humanen CXCL11 handeln muss (Widney *et al.*, 2000).

Es ist bekannt, dass CXCL9, CXCL10 und CXCL11 durch IFN- γ induziert werden (Kaplan *et al.*, 1987; Farber, 1997; Sauty *et al.*, 1999; Dwinell *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2001) und wird durch die vor der Einführung der neuen Nomenklatur für Chemokine benutzten Trivialnamen MIG, IP-10 und I-TAC bereits ausgedrückt. MIG steht für "*monokine induced by IFN- γ* ", IP-10 für "*IFN- γ -induced protein 10*" und I-TAC für "*IFN-inducible T cell alpha chemoattractant*". In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die CXCR3-Liganden in strukturellen Zellen der Haut, vorwiegend in Keratinozyten, durch IFN- γ induzierbar waren, wohingegen das unspezifisch/entzündungsabhängig

regulierte Chemokin CCL20/*MIP-3 α* primär durch TNF α /IL1 β induziert wurde (Abbildung 4.11).

Die INF- γ regulierte Expression von CXCR3-Liganden in entzündlichen Prozessen ist nicht nur bei Menschen und Mäusen bekannt. Auch in Primaten und sogar bei der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* ist die durch IFN- γ induzierte Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nachgewiesen worden (Laing *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002).

5.4 CXCL9, CXCL10 und CXCL11 spielen eine wichtige Rolle in Th1-vermittelten Immunreaktionen.

Das Th1/Th2 Konzept ist auf Ergebnisse von Mosmann und Coffman zurückzuführen, die in einem Mausmodell zwei verschiedene Immunantworten von T-Helfer-(Th)-Lymphozyten beobachten konnten. Die als Th1-Zellen bezeichneten T-Zellen bildeten IFN- γ in großen Mengen und die als Th2-Zellen bezeichneten Lymphozyten bildeten IL-4, IL-5 und IL-10 (Mosmann *et al.*, 1989). Darüber hinaus existieren Unterschiede zwischen den Th1- und den Th2-Zellen bezüglich ihrer Chemokinrezeptorexpression. Th2-Lymphozyten prägen überwiegend CCR3, CCR4 und CCR8 aus und Th1-Lymphozyten CCR5 und CXCR3 (Sallusto *et al.*, 1998; Homey *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer Regulation durch IFN- γ werden die CXCR3-Liganden neben der allergischen Kontaktdermatitis auch in anderen Th1-vermittelten entzündlichen Erkrankungen induziert, wie beispielsweise in Psoriasis (Gottlieb *et al.*, 1988; Stoof *et al.*, 2001), in Multiple Sklerose (Balashov *et al.*, 1999; Salmaggi *et al.*, 2002; Belperio *et al.*, 2003), Arteriosklerose (Mach *et al.*, 1999), rheumatischer Arthritis (Patel *et al.*, 2001), Transplantationsreaktionen (Belperio *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) und entzündlichen Darmerkrankungen (Lacroix-Lamande *et al.*, 2002).

Die CXCR3-Liganden übernehmen aber auch Funktionen in nicht-entzündlichen Vorgängen. So wird CXCL10 konstitutiv von den stromalen Zellen des Thymus, der Milz und der Lymphknoten exprimiert (Gattass *et al.*, 1994). Estradiol und Progesteron induzieren die Expression von CXCL10 und CXCL11 in humanem

Endometrium, was zur Rekrutierung von Natürlichen Killerzellen ins Endometrium während des weiblichen Menstruationszyklus führt (Sentman *et al.*, 2004).

5.5 IFN- γ produzierende T-Effektorzellen vermitteln die allergische Kontaktdermatitis.

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV Reaktion). Lange Zeit wurde postuliert, dass in dieser Reaktion vorwiegend CD4⁺ Th1-Zellen als Effektorzellen fungieren (Janeway *et al.*, 2002).

Nach neueren Erkenntnissen wird eine kontaktallergische Reaktion primär durch Antigen-spezifische CD8⁺ Effektor T-Zellen vermittelt, wobei Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen, die Th2-Zytokine produzieren regulatorische Funktionen übernehmen, die zu einem späteren Zeitpunkt zum Abklingen der Entzündungsreaktion beitragen (Bour *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; Bouloc *et al.*, 1998; Grabbe *et al.*, 1998; Cavani *et al.*, 2000; Kimber *et al.*, 2002; Saint-Mezard *et al.*, 2004). Die CD8⁺ Effektor T-Zellen weisen eine Tc1 Phänotyp auf, das bedeutet sie produzieren in hohem Maße IFN- γ (Kimber *et al.*, 2002; Sebastiani *et al.*, 2002). Auch CD4⁺ Effektorzellen vom Th1 Phänotyp sind an der Auslösung einer kontaktallergischen Reaktion beteiligt (Traidl *et al.*, 2000; Trautmann *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nickel-spezifische T-Zellklone nach Antigen-spezifischer Stimulation mehr IFN- γ produzieren, als nach unspezifischer Stimulation mit PHA. Es sind also IFN- γ produzierende T-Zellen, die die Auslösung der allergischen Kontaktdermatitis vermitteln.

Demnach sind die Effektorzellen in der Lage die Expression von IFN- γ -induzierbaren Chemokinen, wie den CXCR3-Liganden, zu vermitteln. Abe *et al.* konnten zeigen, dass CD8⁺ Effektor T-Zellen die Expression von CXCL10 in Hapten-induzierten Entzündungsreaktionen vermitteln können. In DNFB- und Oxazolone-behandelten BALB/c Mäusen wurde die Expression von CXCL10 in

den betroffenen Hautarealen unterdrückt, wenn vor der Sensibilisierung der Tiere die CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden (Abe *et al.*, 1996).

Zudem exprimieren CD8⁺ Tc1-Effektorzellen, ebenso wie CD4⁺ Th1-Zellen in hohem Maße CXCR3 (Sebastiani *et al.*, 2002). Dies suggeriert, dass die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T-Lymphozyten in kontaktallergischen Entzündungsreaktionen spielen.

5.6 Unspezifisch/entzündungsabhängige Chemokine werden primär durch TNF- α /IL-1 β reguliert.

Im Gegensatz zu den IFN- γ regulierten CXCR3-Liganden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das in allergischen und irritativen Hautreaktionen ausgeprägte, unspezifisch/entzündungsabhängige Chemokin CCL20/MIP-3 α durch die primären proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-1 β reguliert wurde (Abbildung 4.14). Eine Vielzahl von Studien weisen nach, dass epidermale Keratinozyten durch die Stimulation mit Irritantien (z.B. Phenole, Sodiumdodecylsulfat, Tributyltin, etc.) TNF- α produzieren (Corsini *et al.*, 1997; Holliday *et al.*, 1997; Corsini *et al.*, 1998; Newby *et al.*, 2000). TNF- α wird häufig als Hauptmediator einer irritativen Entzündungsreaktion gesehen (Berardesca, 1997).

Daneben spielt TNF- α aber auch im Pathomechanismus der allergischen Kontaktdermatitis eine wichtige Rolle und bewirkt vor allem die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Keratinozyten (Griffiths *et al.*, 1989; Saint-Mezard *et al.*, 2004). Da in der Initiierung der allergischen Kontaktdermatitis ebenso unspezifische, proinflammatorische Mechanismen involviert sind, wie bei der irritativen Kontaktdermatitis, ist es nicht verwunderlich, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Chemokine identifiziert wurden die ausschließlich in den irritativen Hautreaktionen exprimiert werden. Neben den Allergen/Hapten-spezifischen Chemokinen scheinen auch unspezifische/entzündungsabhängige Chemokine an der Ausbildung einer allergischen Kontakthypersensitivität beteiligt zu sein. So zeigen Knockout-Mäuse, die den CCL20/MIP-3 α Rezeptor CCR6 nicht

ausbilden, wesentlich geringere DNFB-induzierte allergische Hautreaktionen als normale Mäuse. (Varona *et al.*, 2001).

CCR6 ist auf dendritischen Zellen und auf „memory“ T-Zellen ausgeprägt und vermittelt die gerichtete Migration dieser Zellen auf CCL20 (Liao *et al.*, 1999; Homey *et al.*, 2000). Außerdem spielt CCL20 bei der Initiierung anderer entzündlicher Hauterkrankungen, wie der Psoriasis, eine Rolle und ist hier auf den CLA+ „skin-homing memory“ T-Zellsubpopulationen exprimiert (Homey *et al.*, 2000). Da CLA+ „skin-homing memory“ T-Zellen auch in der allergischen Kontaktdermatitis die pathogenetisch relevante Leukozytenpopulation darstellen (siehe 5.7) unterstreicht dies, dass CCL20 auch zur Vermittlung kontaktallergischer Hautreaktionen beiträgt.

5.7 Die CXCR3-Liganden kooperieren mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12/*SDF-1* α in der Rekrutierung von „memory“ T-Zellen in die Haut.

Wie bereits erwähnt, ist die Rekrutierung von distinkten Leukozytenpopulationen an den Ort der Antigenexposition essenziell für die Ausbildung einer allergischen oder irritativen Hautreaktion. Chemokine binden an extrazelluläre Matrix und bilden stabile Gradienten, die die Migration von Leukozyten in periphere Gewebe, wie die Haut, steuern (Butcher *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2000).

Die vergleichende Analyse der Chemokinexpression während allergischen und irritativen Immunreaktionen in Mensch und Maus haben demonstriert, dass ein komplexes zeitliches und räumliches Netzwerk der Expression homöostatischer und inflammatorischer Chemokine existiert. So konnte in immunhistochemischen Untersuchungen eine Koloalisation von inflammatorischen (CXCL9, CXCL10) und homöostatischen (CXCL12/*SDF-1* α) Chemokinen in NiSO₄-induzierten, allergischen Hautreaktionen beobachtet werden (Abbildung 4.11, 4.12 und 4.13).

In dem nachfolgendem Teil der Arbeit wurde die *in-vitro* Funktionalität der CXCR3-Liganden überprüft und dabei die Frage adressiert, ob Chemokine bei

der Rekrutierung relevanter Leukozytenpopulationen miteinander kooperieren können.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Christophe Caux konnte demonstriert werden, dass plasmazytoide dendritische Zellen, trotz einer hohen Dichte an CXCR3-Molekülen an ihrer Oberfläche, keine Migration auf die CXCR3-Liganden zeigten. Eine deutliche migratorische Antwort wurde jedoch durch die Kombination der CXCR3-Liganden mit dem homöostatischen Chemokin CXCL12/*SDF-1 α* induziert. Dem lag eine, durch einen Priming-Effekt vermittelte, synergistische Wirkung der kooperierenden Chemokine zugrunde (Vanbervliet *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Befunde erstmals auf "skin-homing memory" T-Zellen übertragen werden. In Transwell Chemotaxis Experimenten konnte gezeigt werden, dass das homöostatische Chemokin CXCL12/*SDF-1 α* mit den inflammatorischen Chemokinen CXCL9 und CXCL10 in der Rekrutierung von sowohl CD4+CLA+ als auch CD8+CLA+ „memory“ T-Zellen in einer synergistischen Art und Weise kooperierte (Abbildung 4.16 und 4.18). Der Synergismus war, analog zu Vanbervliet *et al.*, auf einen Priming-Effekt zurückzuführen. Die Präinkubation der T-Zellen mit CXCL10 und eine anschließende Migration auf CXCL12 reproduzierte den synergistischen Effekt (Abbildung 4.21).

Das „cutaneous lymphocyte associated antigen“ (CLA) ist ein Oberflächenmarker, der eine Subpopulation von „memory“ T-Zellen kennzeichnet, die ein spezifisches „homing“-Verhalten zur Haut aufweisen (Picker *et al.*, 1990). Von den im Blut zirkulierenden „memory“ T-Zellen sind ca. 5-15% CLA+. In entzündeter Haut prägen 80-95% der „memory“ T-Zellen CLA aus. In anderen Organen sind während entzündlicher Prozesse dagegen nur ca. 10% der läsionalen T-Zellen CLA+ (Picker *et al.*, 1990). CLA interagiert mit E-Selektin, wodurch das Rollen von Leukozyten entlang des Blutgefäßendothels ermöglicht wird (Butcher *et al.*, 1996). So sind also CXCL9 und CXCL10 in Kooperation mit CXCL12 in der Lage, die Migration von Leukozytensubpopulationen zu induzieren, die für entzündliche Hauterkrankungen relevant sind.

Andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass CXCL12 auch mit dem inflammatorischen, mit atopischer Dermatitis-assoziierten Chemokin CCL11/309 bei der Rekrutierung von CD4+CLA+ und CD8+CLA+ T-Zellpopulationen kooperierte (Gombert *et al.*, 2004). Gouwy *et al.* konnten synergistische Wirkungen von Chemokinen auf die Migration von neutrophilen Zellen beobachten. Dabei kooperierten inflammatorische Chemokine, wie CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 und CCL7/MCP-3 sowohl miteinander, als auch mit homöostatischen Chemokinen, wie CXCL12 (Gouwy *et al.*, 2004). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, scheinen dagegen homöostatische Chemokine nicht miteinander bei der Rekrutierung von T-Lymphozyten zu kooperieren (Abbildung 4.19).

Interessant an den Ergebnissen ist, dass T-Zellen auf CXCL9 und CXCL10 alleine nur eine geringe chemotaktische Antwort zeigen, obwohl die Th1-Zellen, wie bereits beschrieben, den CXCR3-Rezeptor ausprägen. Nach Untersuchungen von Sebastiani *et al.* demonstrierten ruhende Th1 T-Zellklone eine gute chemotaktische Antwort auf CXCL10 (Migrationsindex 15), aktivierte Th1-Klone zeigten jedoch eine wesentlich schlechtere Antwort (Migrationsindex 3). Th2 T-Zellklone zeigten weder aktiviert noch unaktiviert eine gute chemotaktische Antwort (Migrationsindex unter 2) auf CXCL10 (Sebastiani *et al.*, 2001). Bei uns lag der Migrationsindex (Migration/Mediumkontrolle) für die Migration von CD4+ und CD8+ T-Zellen auf 1000 ng/ml CXCL10 bei 3. Die Befunde von Sebastiani *et al.* sprechen dafür, dass die von uns verwendeten T-Zellen überwiegend aktiviert waren.

Auf CXCL12 in Kombination mit CXCL9 migrierten die CD4+CLA+ und die CD8+CLA+ T-Zellen in etwa gleich. Auf die Kombination von CXCL12 mit CXCL10 zeigten die CD8+CLA+ T-Zellen hingegen eine wesentlich stärkere migratorische Antwort (Abbildung 4.16 und 4.18). In einer anderen Studie konnte beobachtet werden, dass auch bei Nickel-spezifischen T-Zellklonen CD8+ Zellen ein aktiveres Migrationsverhalten auf CXCL10 zeigten als CD4+ (Sebastiani *et al.*, 2002).

5.8 CXCR3-Liganden regulieren die Rekrutierung von Entzündungszellen *in-vivo*.

In Adoptivtransferexperimenten ist es möglich, die Kontakthypersensitivität gegen ein Hapten von sensibilisierten Mäusen auf naive Rezipientenmäuse zu übertragen, indem Lymphknotenzellen und/oder Milzzellen in die Empfänger transferiert werden (Asherson *et al.*, 1968; Thomas *et al.*, 1980; Nakagawa *et al.*, 1997).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Adoptivtransferexperimenten zeigten die Rezipientenmäuse, die CXCL10-stimulierte Zellen injiziert bekommen haben, eine signifikant stärkere DNFB-induzierte Entzündung, als Tiere, denen unstimulierte Zellen injiziert wurden. Somit konnte erstmals eine *in-vivo* Relevanz für den *in-vitro* beobachteten Priming-Effekt demonstriert werden.

Auch in einer anderen Studie konnte eine *in-vivo* Funktion von CXCL10 bei der Initiierung von Hapten-induzierten allergischen Hautreaktionen in Mäusen beobachtet werden. Experimente mit CXCL10^{-/-} defizienten Mäusen zeigten, dass diese eine verminderte kontaktallergische Reaktion auf DNFB im Vergleich zu CXCL10^{+/+} Mäusen aufwiesen, was durch eine schwächere Ohrschwellung und durch eine Reduzierung des zellulären Infiltrates charakterisiert war (Dufour *et al.*, 2002).

5.9 Schlussfolgerungen

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Ergebnisse demonstrieren, dass Allergen/Hapten-spezifisch regulierte Chemokine, die nur in der allergischen Kontaktdermatitis und nicht in der irritativen Kontaktdermatitis ausgeprägt wurden, durch das Th1-Zytokin IFN- γ induzierbar waren. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des unspezifisch/entzündungsabhängigen Chemokins CCL20 primär durch die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-1 β induziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass T-Zellen nach Antigen-spezifischer Stimulation IFN- γ produzieren (Abbildung 4.15). Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen den Grundstein für die Differenzierung zwischen allergischen und irritativen

Hautreaktionen legt. Als Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen ist ein Modell zur Pathogenese der allergischen und irritativen Kontaktdermatitis entwickelt worden (Abbildung 5.1) und wird im Nachfolgenden beschrieben.

Allergene und Irritantien wirken als „danger“ Signale auf die strukturellen Zellen der Haut, vornehmlich auf die Keratinozyten. Daraufhin produzieren Keratinozyten die primären, proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, die wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Keratinozyten vermitteln und die Freisetzung von unspezifischen Chemokinen (z.B. CCL20) aus den Keratinozyten induzieren. Dies führt zur Rekrutierung von T-Lymphozyten an den Ort der Allergen/Irritant-Exposition. In der irritativen Hautreaktion werden T-Zellen, darunter auch zytotoxische T-Zellen, rekrutiert. Die zytotoxischen T-Zellen schädigen u.a. die Keratinozyten, woraus eine vermehrte $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$ Produktion resultiert, was zu einer weiteren Amplifizierung des zellulären Infiltrates führt. In der allergischen Reaktion befinden sich unter den rekrutierten T-Lymphozyten auch Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen, die aus der Blutbahn in das Allergen-exponierte Gewebe einwandern. Diese entlassen das Effektorzytokin $\text{IFN-}\gamma$, welches in den strukturellen Zellen der Haut, wie Keratinozyten und Fibroblasten, die Freisetzung großer Mengen an responsiven Chemokinen, wie CXCL9 , CXCL10 und CXCL11 , induziert. Die Chemokine rekrutieren eine zweite Welle von Leukozyten in die Haut, überwiegend Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen, die wiederum $\text{IFN-}\gamma$ freisetzen, wodurch der entzündliche Prozess weiter vorangetrieben wird. Obwohl mit der ersten Welle der rekrutierten Lymphozyten nur eine kleine Menge an Antigen-spezifischen „memory“ T-Zellen in die Haut gelangt, und deshalb nur geringe Mengen an $\text{IFN-}\gamma$ zur Verfügung stehen, befinden sich im Vergleich dazu verhältnismäßig viele strukturelle Zellen am Entzündungsort, die Chemokine in größeren Mengen freisetzen können.

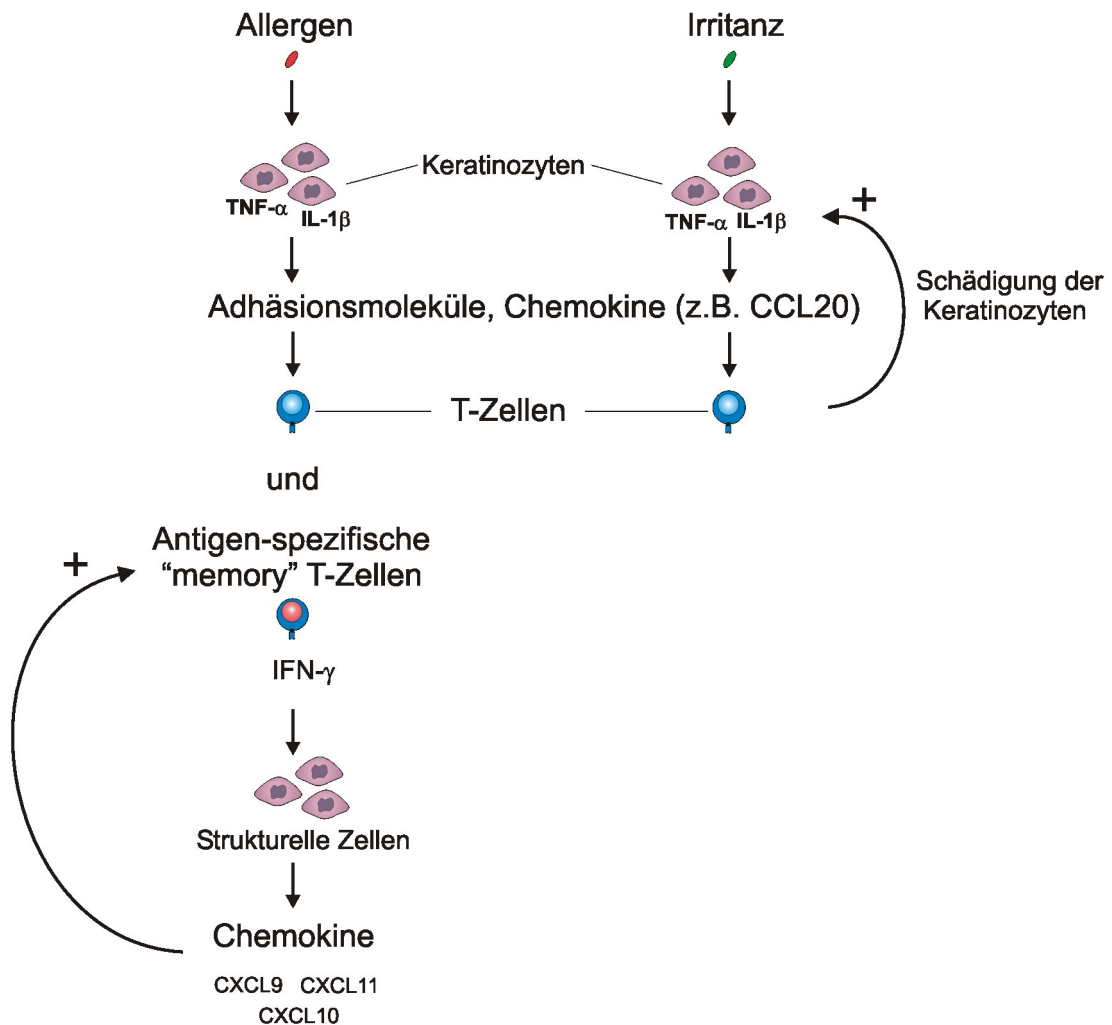


Abbildung 5.1: Pathogenese der Chemikalien-induzierten allergischen und irritativen Kontaktdermatitis. Allergene und Irritantien induzieren die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ aus epidermalen Keratinozyten, was u.a. zur Expression von unspezifischen/entzündungsabhängigen Chemokinen (z.B. CCL20) und schließlich zur Rekrutierung von T-Lymphozyten führt. In irritativen Hautreaktionen schädigen zytotoxische T-Lymphozyten die Keratinozyten, woraus eine vermehrte $\text{TNF-}\alpha$ / $\text{IL-1}\beta$ resultiert, was zur Amplifizierung des Entzündungsprozesses führt. In allergischen Hautreaktionen befinden sich Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen unter den rekrutierten T-Lymphozyten, die durch die Produktion von $\text{IFN-}\gamma$ die Freisetzung von Allergen/Hapten-spezifischen Chemokinen (CXCL9, CCL10 und CXCL11) induziert. Diese rekrutieren weitere Antigen-spezifische „memory“ T-Zellen, wodurch der entzündliche Prozess weiter vorangetrieben wird.

5.10 Ausblick/Entwicklung

Aufgrund der Anreicherung von Chemikalien in unserer Umwelt, mit denen wir regelmäßig in Kontakt kommen, hat auch die Zahl der Menschen, die an einer Chemikalien-induzierten allergischen oder irritativen Kontaktdermatitis erkranken, zugenommen. Die Therapie von chronisch entzündlichen Hauterkrankungen basiert zurzeit auf der Minimierung der Entzündungsreaktion durch immunsuppressive Medikamente (z.B. Glukokortikosteroide, Ciclosporin A), die aufgrund ihrer großen Nebenwirkungen nicht über längere Zeiträume angewendet werden können. So besteht eine große Nachfrage nach Medikamenten, die eine Prävention von chronischen Hauterkrankungen, wie der allergischen oder irritativen Kontaktdermatitis, ermöglichen oder deren Langzeitbehandlung verbessern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die identifizierten krankheitsassoziierten Chemokine essentiell für die Rekrutierung von pathogenetisch relevanten Leukozytenpopulationen in die Haut sind und somit eine bedeutende Rolle bei der Initiierung und Chronifizierung der allergischen und irritativen Kontaktdermatitis übernehmen. Medikamente, die eine auf Chemokin-/Chemokinrezeptorantagonisten basierende Wirkung haben, stellen demnach gute präventive Therapeutika für die Behandlung von Patienten mit allergischer oder irritativer Kontaktdermatitis dar.

Es gibt bereits Untersuchungen, die zeigen, dass Chemokinantagonisten kontaktallergische Hautreaktionen unterdrücken können. So konnte gezeigt werden, dass das hautassoziierte, homöostatische Chemokin CCL27/*CTACK* an der Rekrutierung von Antigen-spezifischen T-Zellen während allergischen Hautreaktionen maßgeblich beteiligt ist und die Neutralisierung der Interaktion von CCL27 mit seinem Rezeptor CCR10 während der Auslösephase einer kontaktallergischen Reaktion in BALB/c Mäusen zur Unterdrückung einer Entzündungsreaktion führt (Homey *et al.*, 2002). Engeman *et al.* konnten demonstrieren, dass Chemokinantagonisten nicht nur die Rekrutierung von Leukozyten blockieren können, sondern auch auf der Seite der dendritischen Zellen als wirksame Therapeutika eingesetzt werden können. So konnte die Ausbildung einer DNFB-induzierten kontaktallergischen Reaktion in Mäusen dadurch blockiert werden, dass Antikörper gegen das Chemokin

CCL21/6Ckine die Migration von antigenpräsentierenden Langerhanszellen zu den Lymphknoten unterbanden (Engeman *et al.*, 2000). Außerdem bietet die Natur selbst weitere Beispiele für die Wirkung von Chemokinantagonisten. So haben Viren, wie das *Molluscum-contagiosum*-Virus oder das humane Herpesvirus-8, Antagonisten gegen verschiedene Chemokinrezeptoren (CCR8, CCR10) entwickelt und verhindern so ihre Entdeckung und Beseitigung durch das Immunsystem (Lindow *et al.*, 2003).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass spezifisch mit Chemikalien-induzierten allergischen Hautreaktionen assoziierte Chemokine, die CXCR3-Liganden, nicht mit irritativ-toxischen Hautreaktionen assoziiert sind. So bieten die CXCR3-Liganden nicht nur Ansätze für die Entwicklung neuer Therapeutika, sondern sind ebenfalls für die differenzielle Diagnostik von allergischen und irritativen Kontaktdermatitiden von Bedeutung, da sich die Differenzierung zwischen der allergischen und der irritativen Form der Kontaktdermatitis bislang aufgrund des ähnlichen klinischen und histologischen Phänotyps, schwierig gestaltet (Willis *et al.*, 1986; Brasch *et al.*, 1992).

Damit leistet diese Arbeit einen Beitrag für die Weiterentwicklung von Prävention, Therapie und Diagnostik von Chemikalien-induzierten allergischen und irritativen Kontaktdermatitiden.

6. Literatur

- Abe, M., T. Kondo, H. Xu und R. L. Fairchild** (1996). "Interferon-gamma inducible protein (IP-10) expression is mediated by CD8+ T cells and is regulated by CD4+ T cells during the elicitation of contact hypersensitivity." J Invest Dermatol **107**(3): 360-6.
- Anderson, C., A. Hehr, R. Robbins, R. Hasan, M. Athar, H. Mukhtar und C. A. Elmets** (1995). "Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons." J Immunol **155**(7): 3530-7.
- Asherson, G. L. und W. Ptak** (1968). "Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer." Immunology **15**(3): 405-16.
- Balashov, K. E., J. B. Rottman, H. L. Weiner und W. W. Hancock** (1999). "CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6873-8.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, M. D. Burdick, J. P. Lynch, 3rd, D. A. Zisman, Y. Y. Xue, K. Li, A. Ardehali, D. J. Ross und R. M. Strieter** (2003). "Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection." J Immunol **171**(9): 4844-52.
- Berardesca, E.** (1997). "What's new in irritant dermatitis." Clin Dermatol **15**(4): 561-3.
- Berufskrankheiten-Dokumentation, H. d. g. B. e. V.** (2004). BK 5101 Hautkrankheiten.
- Bleul, C. C., J. L. Schultze und T. A. Springer** (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." J Exp Med **187**(5): 753-62.
- Bouloc, A., A. Cavani und S. I. Katz** (1998). "Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells." J Invest Dermatol **111**(1): 44-9.
- Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J. L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J. P. Revillard und J. F. Nicolas** (1995). "Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene." Eur J Immunol **25**(11): 3006-10.
- Brasch, J., J. Burgard und W. Sterry** (1992). "Common pathogenetic pathways in allergic and irritant contact dermatitis." J Invest Dermatol **98**(2): 166-70.
- Braun-Falco, O., G. Plewig und H. H. Wolff** (1996). Dermatologie und Venerologie, Springer-Verlag.
- 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.

- Cavani, A., F. Nasorri, C. Prezzi, S. Sebastiani, C. Albanesi und G. Girolomoni** (2000). "Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses." J Invest Dermatol **114**(2): 295-302.
- Chew, A. L. und H. I. Maibach** (2003). "Occupational issues of irritant contact dermatitis." Int Arch Occup Environ Health **76**(5): 339-46.
- Cole, K. E., C. A. Strick, T. J. Paradis, K. T. Ogborne, M. Loetscher, R. P. Gladue, W. Lin, J. G. Boyd, B. Moser, D. E. Wood, B. G. Sahagan und K. Neote** (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." J Exp Med **187**(12): 2009-21.
- Corsini, E. und C. L. Galli** (1998). "Cytokines and irritant contact dermatitis." Toxicol Lett **102-103**: 277-82.
- Corsini, E., A. Terzoli, A. Bruccoleri, M. Marinovich und C. L. Galli** (1997). "Induction of tumor necrosis factor-alpha in vivo by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs." J Invest Dermatol **108**(6): 892-6.
- D'Apuzzo, M., A. Rolink, M. Loetscher, J. A. Hoxie, I. Clark-Lewis, F. Melchers, M. Baggiolini und B. Moser** (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." Eur J Immunol **27**(7): 1788-93.
- Dickel, H., O. Kuss, A. Schmidt und T. L. Diepgen** (2002). "Occupational relevance of positive standard patch-test results in employed persons with an initial report of an occupational skin disease." Int Arch Occup Environ Health **75**(6): 423-34.
- Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau, G. W. Canonica, C. Jasmin und B. Azzarone** (1998). "Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma." J Clin Invest **101**(10): 2129-39.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane und A. D. Luster** (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." J Immunol **168**(7): 3195-204.
- Dupuis, G.** (1979). "Studies on poison ivy. In vitro lymphocyte transformation by urushiol-protein conjugates." Br J Dermatol **101**(6): 617-24.
- Dvorak, H. F., M. C. Mihm, Jr. und A. M. Dvorak** (1976). "Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man." J Invest Dermatol **67**(3): 391-401.
- Dwinell, M. B., N. Lugering, L. Eckmann und M. F. Kagnoff** (2001). "Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells." Gastroenterology **120**(1): 49-59.
- Engeman, T. M., A. V. Gorbachev, R. P. Gladue, P. S. Heeger und R. L. Fairchild** (2000). "Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hapten sensitization." J Immunol **164**(10): 5207-14.

- Farber, J. M.** (1993). "HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines." Biochem Biophys Res Commun **192**(1): 223-30.
- Farber, J. M.** (1997). "Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes." J Leukoc Biol **61**(3): 246-57.
- Flier, J., D. M. Boorsma, D. P. Bruynzeel, P. J. Van Beek, T. J. Stoof, R. J. Scheper, R. Willemze und C. P. Tensen** (1999). "The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions." J Invest Dermatol **113**(4): 574-8.
- Flier, J., D. M. Boorsma, P. J. van Beek, C. Nieboer, T. J. Stoof, R. Willemze und C. P. Tensen** (2001). "Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation." J Pathol **194**(4): 398-405.
- Gattass, C. R., L. B. King, A. D. Luster und J. D. Ashwell** (1994). "Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes." J Exp Med **179**(4): 1373-8.
- Gawkrodger, D. J., E. McVittie, M. M. Carr, J. A. Ross und J. A. Hunter** (1986). "Phenotypic characterization of the early cellular responses in allergic and irritant contact dermatitis." Clin Exp Immunol **66**(3): 590-8.
- Gombert, M., M. C. Dieu-Nosjean, F. Winterberg, E. Bünemann, R. C. Kubitza, L. Da Cunha, A. Haahtela, S. Lehtimäki, J. Rieker, S. Meller, A. Pivarcsi, A. Koreck, W.-H. Fridman, H.-W. Zentgraf, H. Pavenstädt, A. Amara, C. Caux, L. Kemeny, H. Alenius, A. Lauerma, T. Ruzicka, A. Zlotnik und B. Homey** (2004). "CCL1-CCR8 Interactions: An Axis Mediating the Recruitment of T Cells and Langerhans-Type Dendritic Cells to Atopic Skin Inflammation." J Immunol **in review**.
- Gottlieb, A. B., A. D. Luster, D. N. Posnett und D. M. Carter** (1988). "Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques." J Exp Med **168**(3): 941-8.
- Gouwy, M., S. Struyf, J. Catusse, P. Proost und J. Van Damme** (2004). "Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration." J Leukoc Biol **76**(1): 185-94.
- Grabbe, S. und T. Schwarz** (1998). "Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity." Immunol Today **19**(1): 37-44.
- Griffiths, C. E., J. J. Voorhees und B. J. Nickoloff** (1989). "Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor." J Am Acad Dermatol **20**(4): 617-29.
- Gutwald, J., M. Goebeler und C. Sorg** (1991). "Neuropeptides enhance irritant and allergic contact dermatitis." J Invest Dermatol **96**(5): 695-8.
- Holliday, M. R., E. Corsini, S. Smith, D. A. Basketter, R. J. Dearman und I. Kimber** (1997). "Differential induction of cutaneous TNF-alpha and IL-6 by topically applied chemicals." Am J Contact Dermat **8**(3): 158-64.
- Homey, B.** (2003). Chemokine und ihre Rezeptoren: Schlüsselmoleküle der Pathogenese entzündlicher Hautkrankheiten. Habilitationsschrift zur

- Erlangung der Venia legendi für das Fach Dermatologie des Fachbereichs Humanmedizin. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- 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., 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.PG - 6621-32." J Immunol **164**(12).
- Homey, B. und A. Zlotnik** (1999). "Chemokines in allergy." Curr Opin Immunol **11**(6): 626-34.
- Hosoe, N., S. Miura, C. Watanabe, Y. Tsuzuki, R. Hokari, T. Oyama, Y. Fujiyama, H. Nagata und H. Ishii** (2004). "Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(3): G458-66.
- Hunziker, T., C. U. Brand, A. Kapp, E. R. Waelti und L. R. Braathen** (1992). "Increased levels of inflammatory cytokines in human skin lymph derived from sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis." Br J Dermatol **127**(3): 254-7.
- HVBG** (2004). "BK 5101 Hautkrankheiten." Berufskrankheiten-Dokumentation (BK-DOK) des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG).
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport und M. Shlomchik** (2002). Immunologie. Heidelberg; Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Kaplan, G., A. D. Luster, G. Hancock und Z. A. Cohn** (1987). "The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin." J Exp Med **166**(4): 1098-108.
- Kim, C. H., L. M. Pelus, J. R. White und H. E. Broxmeyer** (1998). "Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines." Blood **91**(12): 4434-43.
- Kimber, I. und R. J. Dearman** (2002). "Allergic contact dermatitis: the cellular effectors." Contact Dermatitis **46**(1): 1-5.
- Kondo, S., S. Pastore, G. M. Shivji, R. C. McKenzie und D. N. Sauder** (1994). "Characterization of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatitis as well as irritant contact dermatitis in mouse skin." Lymphokine Cytokine Res **13**(6): 367-75.
- Kraft, M., S. Riedel, C. Maaser, T. Kucharzik, A. Steinbuechel, W. Domschke und N. Luegering** (2001). "IFN-gamma synergizes with TNF-alpha but not with viable H. pylori in up-regulating CXC chemokine secretion in gastric epithelial cells." Clin Exp Immunol **126**(3): 474-81.

- Kucenic, M. J. und D. V. Belsito** (2002). "Occupational allergic contact dermatitis is more prevalent than irritant contact dermatitis: a 5-year study." J Am Acad Dermatol **46**(5): 695-9.
- Lacroix-Lamande, S., R. Mancassola, M. Naciri und F. Laurent** (2002). "Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection." Infect Immun **70**(4): 2090-9.
- Laing, K. J., N. Bols und C. J. Secombes** (2002). "A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembles the closely related interferon-gamma-inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11." Eur Cytokine Netw **13**(4): 462-73.
- Larsson-Stymne, B. und L. Widstrom** (1985). "Ear piercing--a cause of nickel allergy in schoolgirls?" Contact Dermatitis **13**(5): 289-93.
- 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.
- Lilly, C. M., H. Nakamura, H. Kesselman, C. Nagler-Anderson, K. Asano, E. A. Garcia-Zepeda, M. E. Rothenberg, J. M. Drazen und A. D. Luster** (1997). "Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids." J Clin Invest **99**(7): 1767-73.
- Lindow, M., H. R. Luttichau und T. W. Schwartz** (2003). "Viral leads for chemokine-modulatory drugs." Trends Pharmacol Sci **24**(3): 126-30.
- Loffler, H., I. Effendy und R. Happle** (2000). "[Irritant contact dermatitis]." Hautarzt **51**(3): 203-15.
- Luster, A. D., J. C. Unkeless und J. V. Ravetch** (1985). "Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins." Nature **315**(6021): 672-6.
- Mach, F., A. Sauty, A. S. Iarossi, G. K. Sukhova, K. Neote, P. Libby und A. D. Luster** (1999). "Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells." J Clin Invest **104**(8): 1041-50.
- Marks, R. (1992). The pathology and pathogenesis of the eczematous reaction. Eczema. R. Marks. London, Martin Dunitz Ltd: 21-36.
- McKenzie, R. C. und D. N. Sauder** (1990). "The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity." J Invest Dermatol **95**(6 Suppl): 105S-107S.
- Meding, B.** (2000). "Differences between the sexes with regard to work-related skin disease." Contact Dermatitis **43**(2): 65-71.
- Meding, B. und G. Swanbeck** (1989). "Epidemiology of different types of hand eczema in an industrial city." Acta Derm Venereol **69**(3): 227-33.
- Menne, T., O. Borgan und A. Green** (1982). "Nickel allergy and hand dermatitis in a stratified sample of the Danish female population: an epidemiological study including a statistic appendix." Acta Derm Venereol **62**(1): 35-41.

- Mochizuki, M., J. Bartels, A. I. Mallet, E. Christophers und J. M. Schroder** (1998). "IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy." J Immunol **160**(1): 60-8.
- Mosmann, T. R. und R. L. Coffman** (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Nakagawa, T., D. Oka, S. Nakagawa, H. Ueki und T. Takaiwa** (1997). "Draining lymph node cells of contact-sensitized mice induce suppression of contact sensitivity." J Invest Dermatol **108**(5): 731-6.
- Newby, C. S., R. M. Barr, M. W. Greaves und A. I. Mallet** (2000). "Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate." J Invest Dermatol **115**(2): 292-8.
- Ohmori, Y. und T. A. Hamilton** (1990). "A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1261-7.
- Patel, D. D., J. P. Zachariah und L. P. Whichard** (2001). "CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium." Clin Immunol **98**(1): 39-45.
- 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.
- Reinhart, T. A., B. A. Fallert, M. E. Pfeifer, S. Sanghavi, S. Capuano, 3rd, P. Rajakumar, M. Murphey-Corb, R. Day, C. L. Fuller und T. M. Schaefer** (2002). "Increased expression of the inflammatory chemokine CXC chemokine ligand 9/monokine induced by interferon-gamma in lymphoid tissues of rhesus macaques during simian immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome." Blood **99**(9): 3119-28.
- Riemann, H., T. Schwarz und S. Grabbe** (2003). "Pathomechanismen der Auslösephase der allergischen Kontaktdermatitis." Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **8**(1): 613.
- Rollins, B. J., C. C. Morton, D. H. Ledbetter, R. L. Eddy, Jr. und T. B. Shows** (1991). "Assignment of the human small inducible cytokine A2 gene, SCYA2 (encoding JE or MCP-1), to 17q11.2-12: evolutionary relatedness of cytokines clustered at the same locus." Genomics **10**(2): 489-92.
- Rossi, D. und A. Zlotnik** (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.
- Saint-Mezard, P., F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian und J. F. Nicolas** (2004). "The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis." Eur J Dermatol **14**(3): 131-8.
- Saint-Mezard, P., A. Rosieres, M. Krasteva, F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian und J. F. Nicolas** (2004). "Allergic contact dermatitis." Eur J Dermatol **14**(5): 284-95.
- Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay und A. Lanzavecchia** (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." J Exp Med **187**(6): 875-83.

- Salmaggi, A., M. Gelati, A. Dufour, E. Corsini, S. Pagano, R. Baccalini, E. Ferrero, S. Scabini, V. Silei, E. Ciusani und M. De Rossi** (2002). "Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis." J Interferon Cytokine Res **22**(6): 631-40.
- Saloga, J., J. Knop und G. Kolde** (1988). "Ultrastructural cytochemical visualization of chromium in the skin of sensitized guinea pigs." Arch Dermatol Res **280**(4): 214-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.**, (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbour Laboratory Press New York, USA.
- Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid und A. D. Luster** (1999). "The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells." J Immunol **162**(6): 3549-58.
- Scholzen, T. E., S. Stander, H. Riemann, T. Brzoska und T. A. Luger** (2003). "Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme." J Immunol **170**(7): 3866-73.
- Sebastiani, S., C. Albanesi, F. Nasorri, G. Girolomoni und A. Cavani** (2002). "Nickel-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Display Distinct Migratory Responses to Chemokines Produced During Allergic Contact Dermatitis." J Invest Dermatol **118**(6): 1052-8.
- Sebastiani, S., P. Allavena, C. Albanesi, F. Nasorri, G. Bianchi, C. Traidl, S. Sozzani, G. Girolomoni und A. Cavani** (2001). "Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity." J Immunol **166**(2): 996-1002.
- Sentman, C. L., S. K. Meadows, C. R. Wira und M. Eriksson** (2004). "Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone." J Immunol **173**(11): 6760-6.
- Sinigaglia, F.** (1994). "The molecular basis of metal recognition by T cells." J Invest Dermatol **102**(4): 398-401.
- Stoof, T. J., J. Flier, S. Sampat, C. Nieboer, C. P. Tensen und D. M. Boorsma** (2001). "The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells." Br J Dermatol **144**(6): 1114-20.
- Tensen, C. P., J. Flier, E. M. Van Der Raaij-Helmer, S. Sampat-Sardjoepersad, R. C. Van Der Schors, R. Leurs, R. J. Scheper, D. M. Boorsma und R. Willemze** (1999). "Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3)." J Invest Dermatol **112**(5): 716-22.
- Teran, L. M., M. Mochizuki, J. Bartels, E. L. Valencia, T. Nakajima, K. Hirai und J. M. Schroder** (1999). "Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 777-86.

- Thomas, W. R., A. J. Edwards, M. C. Watkins und G. L. Asherson** (1980). "Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizers fluorescein isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers form immunogenic complexes with different cell populations." Immunology **39**(1): 21-7.
- 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.
- Townson, J. R., L. F. Barcellos und R. J. Nibbs** (2002). "Gene copy number regulates the production of the human chemokine CCL3-L1." Eur J Immunol **32**(10): 3016-26.
- Traidl, C., S. Sebastiani, C. Albanesi, H. F. Merk, P. Puddu, G. Girolomoni und A. Cavani** (2000). "Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes." J Immunol **165**(6): 3058-64.
- Trautmann, A., M. Akdis, D. Kleemann, F. Altnauer, H. U. Simon, T. Graeve, M. Noll, E. B. Brocker, K. Blaser und C. A. Akdis** (2000). "T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis." J Clin Invest **106**(1): 25-35.
- 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.
- Vanguri, P. und J. M. Farber** (1990). "Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine." J Biol Chem **265**(25): 15049-57.
- Varona, R., R. Villares, L. Carramolino, I. Goya, A. Zaballos, J. Gutierrez, M. Torres, A. C. Martinez und G. Marquez** (2001). "CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses." J Clin Invest **107**(6): R37-45.
- Vetter, C.** (1998). "Berufsdermatosen: Forschungsdefizite bei der Expositionserfassung." Deutsches Aertzeblatt **95**(47): A-2972.
- Wagner, K., U. Dendorfer, S. Chilla, D. Schlondorff und B. Luckow** (2001). "Identification of new regulatory sequences far upstream of the mouse monocyte chemoattractant protein-1 gene." Genomics **78**(3): 113-23.
- Wang, B., H. Fujisawa, L. Zhuang, I. Freed, B. G. Howell, S. Shahid, G. M. Shivji, T. W. Mak und D. N. Sauder** (2000). "CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity." J Immunol **165**(12): 6783-90.
- Widney, D. P., Y. R. Xia, A. J. Lusis und J. B. Smith** (2000). "The murine chemokine CXCL11 (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant) is an IFN-gamma- and lipopolysaccharide-inducible glucocorticoid-attenuated response gene expressed in lung and other tissues during endotoxemia." J Immunol **164**(12): 6322-31.

- Willis, C. M., E. Young, D. R. Brandon und J. D. Wilkinson** (1986). "Immunopathological and ultrastructural findings in human allergic and irritant contact dermatitis." Br J Dermatol **115**(3): 305-16.
- Wong, S. S., M. T. Chan, S. L. Gan, S. K. Ng und C. L. Goh** (1998). "Occupational chromate allergy in Singapore: a study of 87 patients and a review from 1983 to 1995." Am J Contact Dermat **9**(1): 1-5.
- Xu, H., N. A. Dilulio und R. L. Fairchild** (1996). "T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells." J Exp Med **183**(3): 1001-12.
- Yu, H. S., C. H. Lee, S. H. Jee, C. K. Ho und Y. L. Guo** (2001). "Environmental and occupational skin diseases in Taiwan." J Dermatol **28**(11): 628-31.
- Zhang, Z., L. Kaptanoglu, Y. Tang, D. Ivancic, S. M. Rao, A. Luster, T. A. Barrett und J. Fryer** (2004). "IP-10-induced recruitment of CXCR3 host T cells is required for small bowel allograft rejection." Gastroenterology **126**(3): 809-18.
- Zlotnik, A. und O. Yoshie** (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

Lebenslauf

Name	Franziska Winterberg
Geburtsdatum	20.10.1975
Geburtsort	Essen
Familienstand	unverheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982 -1986	Gemeinschaftsgrundschule, Schermbeck
1986 -1995	Gymnasium Petrinum, Dorsten

Hochschulbildung

Okt. 1995 - Feb. 2002	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum; Abschluss: Diplom
Mai 2002 - Jan. 2005	Promotionsstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für das Fach Biologie