

Aus der Klinik und Poliklinik  
für Dermatologie und Venerologie  
der Medizinischen Hochschule Hannover  
(Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. habil. A. Kapp)

# **Zytokinexpression bei allergischer Kontaktdermatitis**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Melanie Hartmann  
aus Berlin

Hannover 2003

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover  
am: 15. März 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Prof. Dr. Horst von der Hardt
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. Thomas Werfel
Referent:	Prof. Dr. Reinhold Förster
Koreferent:	Priv.-Doz. Dr. Jens Hohlfeld

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2004

Promotionsausschußmitglieder:	Prof. Dr. Henning Zeidler
	Prof. Dr. Gorig Brunner
	Prof. Dr. Jörn Elsner

Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>0. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Definition, Morphe und Histologie der Ekzemreaktion.....	7
1.2 Immunologische Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis .....	8
1.3 Epidemiologie und Pathomechanismus der Nickel-Kontaktdermatitis .....	9
1.4 In vivo und in vitro Diagnostik bei Kontaktsensibilisierungen .....	10
1.5 Subtypen der T-Helferzellen und deren Zytokinproduktion.....	11
1.6 Gegenseitige Beeinflussung der Th-Subtypen .....	12
1.7 Definition, Struktur und Pathomechanismus von Superantigenen .....	13
1.8 Problemstellung .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Gewinnung mononukleärer peripherer Blutlymphozyten (PBMC).....	16
2.2 Kultivierung der Zellen für den Lymphozytentransformationstest (LTT) .....	17
2.3 Messung der Zelltransformation .....	17
2.4 Gewinnung von Lymphozyten aus Dermis und Epidermis .....	18
2.5 Herstellung von T-Zellklonen aus Blut und Haut.....	19
2.6 Expansion der T-Lymphozyten in Zellkulturen, Kryokonservierung.....	20
2.7 Frequenzanalyse der kultivierten Lymphozyten .....	21
2.8 Antigen-spezifische Proliferationstests .....	22
2.9 Hemmung der spezifischen Proliferation durch anti-HLA-DR-Antikörper .....	22
2.10 Phänotypisierung der T-Zellklone (TCC) .....	23

2.11	Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA.....	24
2.12	Messung intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie .....	25
2.13	CD4/ CD8 Selektion über Beads .....	26
2.14	Gewinnung von dermalen und epidermalen Zellen aus Haut .....	27
2.15	Kokultivierung von T-Lymphozyten mit dermalen und epidermalen Zellen .....	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Methodische Vorversuche.....	29
3.1.1	Nachweis einer Nickel-allergischen Reaktion in vitro .....	29
3.1.2	Kinetische Bestimmung von sezerniertem IFN- $\gamma$ durch stimulierte T-Zellklone.....	30
3.2	Einfluß des Kompartiments auf die Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten bei Nicht-Atopikern .....	31
3.3	Untersuchung des Zytokinmusters in frisch isolierten T-Zellen aus Epikutantest-Reaktionen gegen unterschiedliche Kontaktallergene.....	36
3.4	Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone aus Epikutantest- Läsionen bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern.....	37
3.5	Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone von atopischen Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis.....	39
3.6	Einfluß des kutanen Mikromilieus auf die Zytokinexpression .....	40
3.6.1	Phänotypisierung der V $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors.....	40
3.6.2	Expression von IL-4 in Nickel-spezifischen T-Zellklonen unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	42
3.6.3	Expression von IFN- $\gamma$ in Nickel-spezifischen T-Zellklonen unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	44
3.6.4	Untersuchung des Einflusses von anti-IL-12 Antikörpern auf das Zytokinsekretionsmuster.....	46
3.6.5	Untersuchung des Einflusses von anti-IL-4 Antikörpern auf das Zytokinsekretionsmuster.....	47
3.6.6	Herabmodulation von IL-4 in Kontaktallergen-spezifischen Zellen durch dermale Zellen.....	48

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	Einteilung der T-Helferzellen und ihre Zytokinexpression .....	49
4.2	Einfluß des Kompartiments auf die Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten bei Nicht-Atopikern .....	50
4.3	Untersuchung des Zytokinmusters in frisch isolierten T-Zellen aus Epikutantest-Reaktionen gegen unterschiedliche Kontaktallergene .....	51
4.4	Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone aus Epikutantest- Läsionen bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern.....	51
4.5	Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone atopischer Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis .....	53
4.6	Einfluß des kutanen Mikromilieus auf die Zytokinexpression .....	53
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>
7.1	Wissenschaftliche Publikationen .....	67
7.2	Lebenslauf.....	68
	<b>Erklärung.....</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>70</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	LTT auf Nickelsulfat und Kobaltchlorid .....	29
Tabelle 2	Kinetische Bestimmung von IFN- $\gamma$ durch TCC.....	30
Tabelle 3	Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten nicht-atopischer Individuen aus Blut und Epikutantest-Läsionen bei allergischer Kontaktdermatitis.....	35
Tabelle 4	Intrazelluläre durchflußzytometrische Messung von IL-4 und IFN- $\gamma$ in frisch isolierten Haut-infiltrierenden Lymphozyten aus Epikutantest-Läsionen bei allergischer Kontaktdermatitis nicht-atopischer Spender.....	36
Tabelle 5	IL-4 Sekretion von aktivierten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen.....	37
Tabelle 6	IFN- $\gamma$ Sekretion von aktivierten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen.....	37
Tabelle 7	Zytokinmuster von Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen .....	38
Tabelle 8	Zytokinexpression Nickel-spezifischer TCC atopischer Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis.....	39
Tabelle 9	TCR-V $\beta$ -Typ von TCC aus verschiedenen Kompartimenten. ....	41
Tabelle 10	Hemmung von IL-4 in Nickel-spezifischen TCC nach Kokultivierung mit dermalen Zellsuspensionen.....	43
Tabelle 11	Einfluß von dermalen und epidermalen Zellen auf TCC mit einer hohen „spontanen“ IFN- $\gamma$ Expression.....	44
Tabelle 12	Anstieg von IFN- $\gamma$ positiven TCC durch Kokultur mit dermalen und epidermalen Zellsuspensionen und Superantigenen in Kulturen, in denen nur wenige Zellen spontan IFN- $\gamma$ exprimierten.....	45
Tabelle 13	IL-4 Expression nach 2 bzw. 6 Tagen Kokultivierung von Nickel-spezifischen TCC mit dermalen Zellen.....	48

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	IL-4 Expression in CD3+ T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis .....	32
Abbildung 2	IFN- $\gamma$ Expression in CD3+ T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis .....	33
Abbildung 3	Spezifische IL-4 Expression in CD3+ T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis .....	34
Abbildung 4	TCR-V $\beta$ -Phänotypisierung eines TCC aus Blut .....	40
Abbildung 5	Durchflußzytometrische Messung der intrazellulären Expression von IL-4 in Nickel-spezifischen TCC, die in Medium oder mit dermalen oder epidermalen Zellsuspensionen kokultiviert wurden.....	42
Abbildung 6	IFN- $\gamma$ - und IL-4 Expression eines TCC aus der Dermis (D21) eines nicht-atopischen Spenders mit allergischer Kontaktdermatitis mit und ohne Präinkubation mit anti-IL-12 Antikörpern .....	46
Abbildung 7	IFN- $\gamma$ - und IL-4 Expression eines TCC aus der Dermis (D21) eines nicht-atopischen Spenders mit allergischer Kontaktdermatitis mit und ohne Präinkubation mit anti-IL-4 Antikörpern .....	47
Abbildung 8	Zytokinexpression beim akuten und chronischen Ekzem.....	57



## 0. Abkürzungsverzeichnis

APC	:	antigen presenting cell(s); Antigen präsentierende Zelle(n)
BSA	:	bovines Serumalbumin
CD	:	cluster of differentiation; Gruppe von Antikörpern, die ein Differenzierungsantigen erkennen
CLA	:	cutaneous lymphocyte antigen; kutanes Lymphozytenantigen
ConA	:	Concanavalin A
cpm	:	counts per minute; Zerfälle pro Minute
Der.p.	:	Dermatophagoides pteronyssinus
DMSO	:	Dimethylsulfoxid
DNA	:	desoxyribonucleid acid; Desoxyribonukleinsäure
DTH	:	delayed-type hypersensitivity; Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ
ELISA	:	enzyme linked immunosorbent assay; Enzym-gebundener Immunoabsorptionstest
FACS	:	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	:	fetal calf serum; fötales Kälberserum
FITC	:	Fluorescein-Isothiocyanat
HLA	:	human leukocyte antigen; humanes Leukozytenantigen
IFN	:	Interferon
Ig	:	Immunglobulin
IL	:	Interleukin
LTT	:	Lymphozytentransformationstest
MHC	:	major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	:	messenger ribonucleid acid, Transport-RNA
NK-Zellen	:	natural killer cells, natürliche Killerzellen
PBMC	:	peripheral blood-mononuclear cells (d.h. Lymphozyten und Monozyten)
PBS	:	phosphate buffered saline (= Phosphatpuffer)
PE	:	Phycoerythrin
PeRCP	:	Peridin-Chlorophyll-Protein-Reagenz
PHA	:	Phytohämagglutinin
PMA	:	Phorbol myristate acetate
PPD	:	purified protein derivative
SE(A-E)	:	Staphylogenes Enterotoxin (A-E)
SEM	:	Standard error of mean; Standardfehler
SI	:	Stimulationsindex/-indizes
TCC	:	T cell clone; T-Zellklon
TCR	:	T cell receptor; T-Zellrezeptor
Th-Zelle	:	T helper cell; T-Helferzelle
TGF	:	tumor growth factor, Tumor-Wachstumsfaktor
V $\beta$	:	variable $\beta$ Kette (des T-Zell-Rezeptors)

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition, Morphe und Histologie der Ekzemreaktion

Ekzeme sind nicht-kontagiöse, umschriebene oder großflächige, entzündliche Dermatosen, die sich meist auf die Epidermis und das obere Korium beschränken. In angelsächsischen Ländern hat sich weitgehend das Synonym Dermatitis durchgesetzt, das im deutschsprachigen Raum oft für akute Krankheitsbilder verwendet wird. Ekzeme stellen mit einem Anteil von 20% weltweit die häufigsten Hautkrankheiten dar (*Jung 1995*).

Die bei einem allergischen Kontaktekzem als epidermale und dermale Intoleranzreaktionen definierten entzündlichen Veränderungen können exogen durch bekannte oder unbekannte Noxen provoziert werden. In der Regel bleibt die ekzematöse Reaktion auf die Kontaktstelle beschränkt, kann aber auch hämatogen in andere Körperregionen (z. B. Unterschenkel oder Gesicht) streuen.

Weitere Ekzemformen sind das toxisch irritative, meist scharf begrenzte Kontaktekzem, die multifaktoriell verursachte atopische Dermatitis, das nummuläre, das seborrhoische, das dyshidrotische und das Stauungsekzem. Eine ähnliche Morphe und Histologie aller Ekzeme trotz variabler Ätiologie erklärt sich dadurch, daß die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine die gemeinsame Endstrecke der Ekzempathogenese darstellt (*Barnetson 1993, Burton 1992, Braun-Falco 1995*).

Trotz charakteristischer Morphologie, kann das **klinische Bild** des Ekzems stark variieren. Im *akuten* Stadium stehen exsudativ-entzündliche Vorgänge mit starkem Erythem, ödematöser Schwellung, Bläschenbildung und Nässen im Vordergrund. Ein diskretes lymphozytäres Infiltrat ist bei stärkerer Ausprägung von umschriebenen Papeln und kleinen Papulovesikeln, seltener Vesikeln oder Bullae, durchsetzt. Das *chronische* Ekzem geht mit einer blässeren Rötung, Krustenbildung, feiner Schuppung, Akanthose (Epidermisverdickung) bis hin zur Lichenifikation (vergrößerte Hautfelderung) einher. Bei der allergischen Kontaktdermatitis entstehen die Effloreszenzen oft durch Chronifizierung bei dauerhaftem Allergenkontakt. Sie können z. T. auch aufgrund des subjektiv bestehenden Juckreizes durch Kratzeffekte oder Superinfektionen hervorgerufen werden und zeigen geringe Spontanheilungstendenz.

**Histologisch** erkennt man im akuten Stadium eine schwammartige Auflockerung der Epidermis (Spongiose), bedingt durch ein intrazelluläres Ödem bis zur Bildung von Bläschen, beim chronischen Ekzem Akanthose und Parakeratose (*Jung 1995*). Das mononukleäre Infiltrat in Dermis und Epidermis zeigt T-Helfer-Lymphozyten (größtenteils CD4+), Blutmonozyten und in der Frühphase der allergischen Kontaktdermatitis auch basophile Granulozyten (*Dvorak 1976*).

## 1.2 Immunologische Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis

Die allergische Kontaktdermatitis ist die am häufigsten auftretende Erkrankung vom Ekzemtyp. Sie wird nach Coombs und Gell als verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV klassifiziert. Diese Reaktionsform wird auch als „delayed-type-hypersensitivity“ (DTH) bezeichnet, da es erst 48-72 Stunden nach Allergenkontakt zu einer maximalen Ausprägung der Reaktion mit deutlich sichtbarem Ödem und anschließendem Rückgang der Symptome kommt (*Werfel und Kapp 2000*).

Die Inzidenz variiert in den unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen, da sie von der individuellen Allergenexposition abhängt. Bestimmte Kontaktallergene lassen sich in einigen Berufsgruppen häufiger als in der Gesamtbevölkerung finden. Pflanzliche Allergene wie Gift-Efeu (poison ivy) und Gift-Eiche (poison oak) findet man bevorzugt in den USA (*Werfel und Kapp 2000*). In Europa können vor allem folgende Kontaktstoffe Auslöser einer Kontaktdermatitis sein: Metall-Salze (z.B. Nickelsulfat, Kaliumdichromat), Epoxidharze, Gummihilfsstoffe (z.B. Antioxidantien; Vulkanisierstoffe), Desinfizienzien und Konservierungsstoffe (z.B. Kathon CG, Formalin, Parabene), Duftstoffe, Medikamente und Salbengrundlagen (z.B. Wollwachsalkohole).

Die *Sensibilisierungsphase* läuft vom Patienten unbemerkt ohne klinische Symptome ab. Bei den Auslösern einer allergischen Kontaktdermatitis handelt es sich meistens um niedermolekulare Haptene, die aufgrund ihrer geringen Größe (unter 1 kD) leicht in die Epidermis eindringen. Erst durch Bindung an körpereigene Proteine, sogenannte Carrier, werden sie in „körperfremde“ Moleküle verwandelt („altered self“), also zum Immunogen (*Eisen 1952, Roitt 1987*). Die nachfolgend entstehende Kontaktallergie trägt somit Züge einer Autoimmunantwort, die sistiert, wenn das als fremd erkannte Molekül eliminiert ist, jedoch bei erneuter Exposition - bedingt durch Gedächtniszellen des Immunsystems - erneut auftreten kann.

Ein durch die Epidermis tretendes Hapten wird von Langerhanszellen aufgenommen und über afferente Lymphgefäße in die parakortikalen T-Regionen der regionalen Lymphknoten transportiert (*Silberberg 1974*). Dort findet die Antigenpräsentation in Assoziation mit MHC Klasse II-Molekülen (HLA-DR) an zirkulierende naive T-Lymphozyten statt. Diese werden durch Bindung des Antigens an spezifische T-Zell-Rezeptoren dazu angeregt, sogenannte „Homingfaktoren“ wie das „cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA) zu exprimieren und ins Gewebe, vorzugsweise der Haut, auszuwandern (*Santamaria-Babi 1995*). Ob und wann es zu einer Sensibilisierung kommt, hängt von Dauer und Intensität des Kontakts, der Sensibilisierungstendenz des Allergens, dem momentanen Hautzustand (Barrierefunktion) und der genetischen Disposition ab (*Jung 1995*).

Während der *Auslösephase* genügen geringste Mengen des Kontaktallergens, um die voraktivierten T-Helferzellen (Gedächtniszellen) nach erneuter Antigenpräsentation durch Langerhanszellen,

dermale dendritische Zellen und Makrophagen in der Haut zur Proliferation und Zytokinfreisetzung zu stimulieren. Nach 24-72 Stunden verursachen verschiedene Zytokine aus T-Zellen (wie z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$ ) entweder direkt oder durch Stimulation anderer Zellen, wie z.B. Makrophagen, eine Entzündungsreaktion. Neben T-Zell-Zytokinen kommen in-situ-Zytokine wie IL-12 aus Makrophagen, Keratinozyten oder dendritischen Zellen Schlüsselfunktionen zu (*Yawalkar 2000 a und b*).

### 1.3 Epidemiologie und Pathomechanismus der Nickel-Kontaktdermatitis

Nickelsalze sind heute die häufigsten Auslöser einer Kontaktdermatitis in europäischen Industrieländern (*Andersen 1995, Maibach 1993*), wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer (*Räsänen 1992*). Bei der Sensibilisierung wird vor allem dem in Modeschmuck enthaltenen Nickel eine bedeutsame Rolle zugeschrieben. Armbanduhren, Ringe, Armreifen, Verschlüsse, Brillengestelle, Gürtelschnallen, Hosenknöpfe und Ohringe können an den Hautkontakt-Stellen ein Ekzem hervorrufen. Häufig wird ein Patient erst durch das Stechen von Ohrlöchern auf Nickel sensibilisiert (*Mac Kie 1993*). So lag beispielsweise die Prävalenz eines allergischen Kontaktekzems bei Individuen mit gestochenen Ohrlöchern in einer Studie bei 14,8% und bei Kontrollpersonen ohne Ohrlöcher bei 1,8% (*Nielsen 1993*). Prävalenzen von 5-17% werden in Studien von Schubert et al. angegeben, wobei 75% der Erkrankungen nicht berufsbedingt sind (*Schubert 1988*). Bei Frauen liegt die Prävalenz einer Nickel-Dermatitis bei 10-17% (*Nethercott 1990, Peltonen 1979*), die einer Sensibilisierung (nachgewiesen durch Epikutantestungen) sogar bei 30% (*Andersen 1995*). Bei Männern dagegen wird die Prävalenz einer Sensibilisierung mit 2,2% angegeben (*Nielsen 1993*).

Die grundsätzlich niedrige Sensibilisierungspotenz der Nickel-Ionen wird durch den häufig intensiven Hautkontakt und ihre weite Verbreitung aufgewogen (*Braun-Falco 1995*).

Über die Nahrung (z.B. Schokolade, Hülsenfrüchte, Soja) aufgenommene Nickelsalze können bei vorausgegangener Sensibilisierung im Rahmen einer verzögerten Hypersensitivität zu einem hämatogenen Kontaktekzem mit Pompholyx-artigem Bild führen (*Werfel und Kapp 2000*).

Der Mechanismus der allergischen Kontaktdermatitis wurde für Nickelsulfat ganz besonders detailliert untersucht. Das Metallion bindet vorzugsweise an die Aminosäure Histidin in körpereigenen Peptiden (*Glennon 1982, Romagnoli 1991, Sinigaglia 1994*). Ein Teil dieser nun nickelhaltigen Peptide bindet wiederum an MHC Klasse II-Moleküle, die auf Antigen-präsentierenden Langerhanszellen oder dermalen dendritischen Zellen konstitutionell in der Haut exprimiert werden. Die Erkennung des Nickel-Antigens durch T-Helferzellen ist durch HLA-DR restringiert (*Sinigaglia 1985*) und MHC-Moleküle, das gebundene Peptid oder beide körpereigenen

Moleküle werden durch Nickel derart verändert, daß sie von den T-Zellen als fremd erkannt werden.

#### 1.4 In vivo und in vitro Diagnostik bei Kontaktsensibilisierungen

Zur Diagnostik einer allergischen Kontaktdermatitis stehen heute zwei etablierte Testsysteme zur Verfügung: zur in vivo Diagnostik der *Epikutantest*, zur in vitro Diagnostik der *Lymphozytentransformationstest (LTT)*.

Beim Epikutantest werden die zu testenden Allergene mittels Pflasterstreifen für 24-48 Stunden auf den Rücken des Patienten aufgebracht und die Reaktionen nach 24 bzw. 48 und 72 Stunden abgelesen. Bei einer Sensibilisierung gegen ein Allergen finden sich ekzematöse Hautreaktionen wie unter 1.1 beschrieben; man spricht von Spontanläsionen. Der Epikutantest ist in der Handhabung recht einfach, die Interpretation einer positiven Testreaktion kann jedoch bei der Unterscheidung zwischen spezifischen allergischen und unspezifischen irritativ-toxischen Reaktionen manchmal Schwierigkeiten bereiten. Gelegentlich werden auch falsch-negative oder falsch positive Ergebnisse beobachtet (*Brasch 1994*).

Es wurden neben einer Verschlechterung vorbestehender Ekzeme - allerdings sehr seltene - Neusensibilisierungen durch den Epikutantest beschrieben (*Agrup 1968*). Der Patient muß zur korrekten Durchführung des Tests an drei verschiedenen Tagen die Klinik oder Praxis aufsuchen und darf nicht an therapierefraktären Ekzemreaktionen („eczema creates eczema“) leiden oder kurz zuvor mit topischen Steroiden oder UV-Licht behandelt worden sein.

Der Lymphozytentransformationstest (LTT) stellt ein in-vitro Testverfahren zur Diagnostik einer allergischen Kontaktsensibilisierung dar. Bei diesem Test konnte zunächst mikroskopisch die Lymphozytentransformation zu großen Blasten, später die Proliferation der Lymphozyten mittels Einbau von Tritium-markiertem Thymidin bestimmt werden (*Caron 1965*). Während mehrtägiger Kultur der mononukleären Blutzellen mit dem Antigen kommt es zu einer Aktivierung sensibilisierter T-Lymphozyten durch Erkennen des spezifischen Antigens in Anwesenheit von autologen Histokompatibilitäts-Antigenen auf Antigen-präsentierenden Zellen.

Die erste Publikation über Nickel als untersuchtes Antigen im LTT erschien schon 1962 von Aspegren und Rorsmann (*Aspegren 1962*), aber erst 1970 fanden McLeod et al. trotz 40% falsch negativer Ergebnisse signifikante Unterschiede zwischen Nickelallergikern und Kontrollpersonen (*Mc Leod 1970*). Seither finden sich widersprüchliche Angaben über die Qualität des LTT und seine Korrelation mit dem Epikutantest. Al-Tawil zeigte 1981 die Bedeutung der Konzentration des Antigens in den Testansätzen. So wirkt Nickel in Konzentrationen über 50 µg/ml als schwaches Mitogen, ruft also eine unspezifische Proliferation von Lymphozyten hervor (*Al-Tawil 1981*).

In niedrigen, aber noch eine Epikutantest-Reaktion auslösenden Konzentrationen, findet Al-Tawil nur eine schwache Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,42 - 0,46) zum LTT (Al-Tawil 1981). Andere Forschergruppen berichten dagegen übereinstimmend von einer Sensitivität des LTT für die Nickel induzierte Kontaktdermatitis von mindestens 92% bei einer Spezifität von mindestens 90% (Gimenez-Camarasa 1975, Everness 1990, Räsänen 1992). Räsänen konnte eine Korrelation zwischen Intensität der Epikutantest-Reaktion und Höhe der Stimulation im LTT in nahezu signifikanten Bereichen zeigen ( $0,05 < p < 0,1$ ) (Räsänen 1992). Aufgrund des labortechnischen Aufwandes und vielfältiger Störmöglichkeiten gilt der LTT jedoch nach wie vor eher als experimentelle Methode für die Untersuchung von Kontaktallergien.

## 1.5 Subtypen der T-Helferzellen und deren Zytokinproduktion

Im Mausmodell wurde die Zytokinexpression von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bereits eingehend untersucht. Mosmann et al. teilten 1986 murine T-Helferzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster in zwei Gruppen ein: Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- $\gamma$  („Typ 1-Zytokine“), aber kein oder nur sehr geringe Mengen IL-4. Im Gegensatz dazu produzieren Th2-Zellen IL-4 und IL-5 („Typ 2-Zytokine“), aber kein oder nur sehr wenig IFN- $\gamma$  (Mosmann 1986, Mosmann 1987). Cher et al. injizierten mit unterschiedlichen Antigenen aktivierte, murine T-Helferzellen, sowie das jeweilige Antigen in die Pfoten von Mäusen. Nach Injektion von Th1-Zellen kam es an den Mäusepfoten zu Entzündungsreaktionen, die den zeitlichen Ablauf und die typische Morphologie einer DTH-Reaktion zeigten. Durch Injektion von Th2-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen konnte keine DTH-Reaktion ausgelöst werden (Cher 1987).

Im Gegensatz zu den T-Helferzellen der Maus exprimieren die meisten humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein gemischtes Zytokinprofil (Paliard 1988) und werden „Th0-Zellen“ genannt. Paliard et al. sowie auch Maggi et al. fanden im peripheren Blut gesunder Individuen fast ausschließlich T-Lymphozyten, die sowohl IL-4 als auch IL-2 und IFN- $\gamma$  produzierten (Paliard 1988, Maggi 1988). Nach Antigen- oder Allergenstimulation kann dieses Profil sich entweder zu einem Typ 1- oder Typ 2-Zytokinmuster entwickeln (Del Prete 1995, Parronchi 1991, Wierenga 1990, Wierenga 1991, Yssel 1991). Allergenspezifische T-Lymphozyten aus Epikutantest-Reaktionen auf Proteinallergene bei der atopischen Dermatitis sezernieren in der Mehrzahl Typ 2-Zytokine (Van der Heijden 1991, Parronchi 1992, Sager 1992, Wierenga 1990, Van Reijsen 1992).

Das Typ 2-Zytokin IL-4 beeinflusst unter anderem die IgE-Synthese, vor allem den „Switch“ von der IgM- zur IgE- Produktion in B-Lymphozyten und führt zu einer Vielzahl von lokalen Wirkungen auf die Entzündungsreaktion (Ricci 1994). Das Typ 2-Zytokin IL-5 ist wahrscheinlich das bedeutendste Zytokin für die Eosinophilen-Differenzierung, -Proliferation und -Aktivierung im



Menschen (*Kapp 1995*). Im Rahmen der Chronifizierung von Ekzemen ist es wahrscheinlich, daß die Antigen-spezifische, Typ 2 ähnliche Immunantwort bei der atopischen Dermatitis in eine Entzündungsantwort übergeht, in der andere Zytokine von Bedeutung sind. Diese Hypothese wird durch Befunde gestützt, in denen gezeigt wurde, daß im Vergleich zu normaler Haut in chronisch ekzematöser Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis sowohl die mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  als auch die mRNA-Expression von IL-4 erhöht waren (*Grewe 1994*). Eine erfolgreiche Therapie führte zu einer signifikanten Abnahme der IFN- $\gamma$  Expression in situ. In anderen Untersuchungen wurde eine deutliche Abnahme der IL-4 und IL-13 mRNA und eine Zunahme der IL-12 und IL-5 mRNA in chronisch lässionaler Haut beobachtet (*Hamid 1994, Naseer 1996*). Auch immunhistologisch (*Thepen 1996*) und bei Milbenallergen-spezifischen T-Zellen (*Werfel 1996*) wurde eine IFN- $\gamma$  Expression in der chronischen Phase der atopischen Dermatitis gefunden. Möglicherweise hat die überwiegende Sekretion des Typ 2-Zytokins IL-4 somit nur in der Initialphase der atopischen Dermatitis eine essentielle Bedeutung, wogegen das Typ 1-Zytokin IFN- $\gamma$  maßgeblich für die Unterhaltung einer Entzündungsantwort sein könnte.

Hauser fand, daß Th1 ähnliche Zellen - mehr als Th2 ähnliche Zellen - eine Rolle bei der Pathogenese der atopischen Dermatitis spielen. Klinische und histologische Befunde der atopischen Dermatitis sind manchmal nicht unterscheidbar von denen der allergischen Kontaktdermatitis (*Hauser 1990*).

Kapsenberg et al. isolierten bei zwei nickelallergischen Patienten und einem hautgesunden Kontrollspender aus dem peripheren Blut vorwiegend TCC mit Th1-Zytokinsekretionsmuster (*Kapsenberg 1992*). Auch Werfel et al. konnten bei der Nickelallergie im Blut ein Vorherrschen von Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  zeigen, im Gegensatz zu TCC aus akuten Hautläsionen, welche vorwiegend IL-4 exprimierten (*Werfel 1997b*).

## 1.6 Gegenseitige Beeinflußung der Th-Subtypen

Genauere Untersuchungen zeigten, daß die Entwicklung eines bestimmten Subtyps in vitro durch Anwesenheit der für diesen Subtyp typischen Zytokine bevorzugt abläuft. Le Gros et al. beschrieben IL-4 als notwendigen Faktor für die Entwicklung von IL-4 produzierenden Th2-Zellen (*Le Gros 1990*). Nach Klonierung von purified-protein-derivative (PPD)-stimulierten T-Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder, nicht-atopischer Spender fanden Maggi et al. Zellen, die ein Th1-Zytokinmuster zeigten. Waren dagegen schon in einem frühen Stadium der Zellklonierung blockierende IL-4 bzw. IFN- $\gamma$ -Antikörper vorhanden, so entwickelten sich TCC, die neben IFN- $\gamma$  und IL-2 auch IL-4 und IL-5 produzierten (Th0-Typ). Umgekehrt entwickelten sich in unbeeinflußten Versuchsansätzen von Der.p.-spezifischen PBMC atopischer Spender Th2-Zellen,

in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  bzw. anti-IL-4 ausschließlich TCC mit Th1-Sekretionsmuster (*Maggi 1992*).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß durch Langerhanszellen produziertes IL-12 eine Ausprägung in Richtung Th1-Zytokinmuster (*Tada 2000*) triggert und damit die In-vitro-Produktion von IL-4 reduziert (*Habu 2001*). Neben Langerhanszellen wurden auch Keratinozyten als Produzenten von IL-12 gefunden (*Sugaya 1999*). Beim Menschen könnte eine hohe lokale Produktion von IL-12 durch dendritische Zellen und Makrophagen für eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion in chronischen Läsionen verantwortlich sein und eine Schlüsselfunktion für die Chronifizierung der Entzündungsantwort der atopischen Dermatitis haben (*Habu 2001*). Ein synergistischer Effekt konnte für IL-18 gezeigt werden, welches von Keratinozyten auf mRNA- und Protein-Ebene produziert wird (*Companjen 2000*).

Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß die Zytokinproduktion der T-Zellen in der Mikroumgebung der Haut durch die oben genannten oder andere Zytokine beeinflusst wird, sei es durch Zytokinproduktion der T-Zellen selbst oder durch residente Zellen der Haut.

## 1.7 Definition, Struktur und Pathomechanismus von Superantigenen

Da Superantigene in einem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Modell benutzt wurden, um eine spezifische Bindung von Antigen an den T-Zellrezeptor zu unterstützen, sollen an dieser Stelle einige Grundbegriffe erklärt werden.

Der Begriff Superantigen wurde 1989 von White et al. geprägt und beschreibt eine Gruppe bakterieller und viraler Proteine, die sich von herkömmlichen Antigenen unterscheiden (*White 1989, Kotzin 1993*). Enterotoxine von Staphylokokken, wie die staphylogenen Enterotoxine A bis E (SEA bis SEE), sind die ersten bekannt gewordenen Superantigene (*Johnson 1992*). Schon 1970 beschrieben Huang und Bergdoll das Enterotoxin B als ein Protein mittlerer Größe, das aus hydrophilen Aminosäuren in  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besteht, welche teilweise auch zu  $\alpha$ -Helices gewunden sind (*Huang 1970*). 1993 fanden Micusan et al., daß es sich bei den Enterotoxinen um 26-28 kD große Proteine aus 228-239 Aminosäuren und einer Disulfidbrücke handelt (*Micusan 1993*).

Superantigene binden nicht nach dem Prinzip der HLA-Restriktion klassischer Allergene innerhalb der spezifischen Antigen-Erkennungsstelle der MHC Proteine, sondern lagern sich von außen an diese an (*Dellabona 1990, Jardetzky 1994, Thibodeau 1997*). HLA Klasse-II Allele zeigen zwar Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeit, Superantigene zu binden, eine Interaktion ist aber letztlich fast immer möglich (*Herman 1990, Herrmann 1989*). Bei der Bindung an den T-Zell-Rezeptor zeigen Superantigene ebenfalls Unterschiede zu konventionellen Antigenen. So erfolgt die



Superantigenbindung nicht an den hypervariablen Anteil des T-Zell-Rezeptors, sondern an dessen variable V $\beta$ -Kette (*Kappler 1989, Germain 1994*). Dabei zeigt jedes Enterotoxin eine spezielle Affinität zu bestimmten V $\beta$ -Subtypen. Während ein konventionelles Antigen nur von jeder 10<sup>6</sup>. T-Zelle spezifisch erkannt wird, vermag ein Superantigen T-Zellen - unabhängig von deren Spezifität - zur Expression der „passenden“ TCR-V $\beta$  Kette zu aktivieren. Damit ist es in der Lage, bis zu 20% aller T-Zellen zu aktivieren. Die T-Zellaktivierung durch Superantigene ist zwar nicht MHC restringiert, aber eine Bindung an MHC Klasse II- Moleküle ist für eine T-Zellaktivierung notwendig. Auf eine Antigenprozessierung durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) kann aber verzichtet werden, weil T-Zellen auf intakte Toxine reagieren, diese also nicht erst in Peptide gespalten werden müssen (*Fleischer 1988, Schrezenmeier 1987*).

## 1.8 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zytokinmuster bei allergischer Kontaktdermatitis untersucht. Um Unterschiede im Zytokinmuster Nickel-spezifischer T-Zellklone von Atopikern und Nicht-Atopikern zu unterscheiden, wurden die Expressionen von IL-4 und IFN- $\gamma$  in T-Zellklonen aus Epikutantest-Läsionen atopischer Patienten mit bereits vorpublizierten Befunden nicht-atopischer Individuen verglichen und auch der Einfluß der Mikroumgebung untersucht. Hierbei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Läßt sich die zuvor an Allergen-spezifischen TCC aus Epikutantest-Reaktionen auf Nickel gewonnene Beobachtung einer IL-4 Sekretion (*Werfel 1997a*) auf frisch aus der Haut isolierte T-Zellen übertragen?
2. Hat das Vorliegen einer Atopie einen Einfluß auf das Zytokinmuster bei allergischer Kontaktdermatitis?
3. Lassen sich die publizierten Eigenschaften Allergen-spezifischer Blutlymphozyten bei Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis auf Zellen aus ekzematöser Haut übertragen?
4. Läßt sich der Switch im Zytokinmuster von einem Th2-Muster zu einem Th1-Muster, welcher bei der Chronifizierung der atopischen Dermatitis beobachtet wurde, auch auf die Kontaktdermatitis übertragen?
5. Welchen Einfluß haben dermale und epidermale Zellen auf das Zytokinmuster der allergischen Kontaktdermatitis?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Gewinnung mononukleärer peripherer Blutlymphozyten (PBMC)

Material:

ISCOVE-Basismedium: 15 mg/l Phenolrot; 3,024 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne L-Glutamin (Seromed, Berlin)

Ficoll (d = 1,077 g/ml) (Lymphoprep, Immuno GmbH, Heidelberg)

LTT-Medium (IAB-Medium 4%): ISCOVE-Basismedium (Seromed, Berlin) + 4% Hitze-inaktiviertes AB-Serum, + 50 µg/ml Gentamycin, + 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, + 2mM L-Glutamin (2 mM), + 1% nichtessentielle Aminosäuren

Objektträger, Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm<sup>2</sup> (Neubauer-Improved, Jürgens, Hannover)

Probenröhrchen 50 ml, steril, mit Schraubverschluß (Greiner GmbH, Frickenhausen)

Zur Gewinnung peripherer Leukozyten aus dem Blut wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Vollblut über Ficoll-Hypaque durchgeführt. Heparinisiertes, venöses Blut wurde dazu 1:1 mit ISCOVE-Basismedium verdünnt, 1:2 über Ficoll geschichtet und 40 Minuten mit 400 x g zentrifugiert. Ficoll hat eine höhere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine niedrigere als Granulozyten und Erythrozyten, so daß nach der Zentrifugation Lymphozyten an der Grenze zwischen Ficoll und Medium entnommen werden können. Diese Interphase wurde in 10 ml ISCOVE-Basismedium aufgenommen und 15 Minuten mit 400 x g zentrifugiert. Um die noch im Sediment enthaltenen Thrombozyten zu entfernen, schlossen sich zwei weitere Waschgänge mit ISCOVE-Basismedium und 15-minütiger Zentrifugation mit 150 x g an. Nach Aufnehmen des Zellpellets in 10 ml LTT-Medium wurden wenige Mikroliter mit Türk'scher Lösung gefärbt und die Zahl der gewonnenen Lymphozyten lichtmikroskopisch in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Die mit dieser Methode gewonnenen Zellen wurden in Lymphozyten-Transformations-Tests, für Langzeitkultivierungen, sowie nach Bestrahlung mit einer Cäsiumquelle (<sup>37</sup> Cs, 55 Gray) als Antigen-präsentierende Zellen bei Klonierungs- und Proliferationsexperimenten oder als „Feeder“-Zellen (2.6) eingesetzt.

## 2.2 Kultivierung der Zellen für den Lymphozytentransformationstest (LTT)

### Material:

96-Napf-Rundbodenplatte mit Deckel (Nunc GmbH, Wiesbaden)  
 NiSO<sub>4</sub>-Lösung 5% in ISCOVE-Basismedium (Brial Allergen GmbH, Greven)  
 Tetanustoxoid (Behringwerke, Hannover/Marburg)  
 Phythämagglutinin (PHA), M-Form, Gibco Life Technologies, Hamburg)  
 Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)  
 ISCOVE-Basismedium (Seromed, Berlin) wie unter 2.1 beschrieben

Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  ISCOVE-Basismedium in eine 96-Napf-Rundbodenplatte pipettiert. Nickelsulfat wurde in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  pro Ansatz zugegeben: die Endkonzentrationen betragen  $10^{-4}$  mol/l (entsprechend 15,4  $\mu\text{g/ml}$ ),  $5 \times 10^{-5}$  mol/l,  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l, sowie  $1,25 \times 10^{-5}$  mol/l. Positivkontrollen wurden mit Tetanustoxoid (10  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) oder mit PHA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert, Negativkontrollen mit 100  $\mu\text{l}$  Medium ohne Stimulus versehen. Die Kultivierung der jeweils sechsfachen Ansätze erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für fünf Tage.

## 2.3 Messung der Zelltransformation

### Material:

Tritium-markiertes Thymidin (3H-Thymidin) 10  $\mu\text{Ci/ml}$  (Amersham Buchler, Braunschweig)  
 Zellerntegerät (Skatron Harvester, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/M.)  
 Filtermatten für 12-Loch-Erntegerät (Skatron, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/M.)  
 Bio-Vial Meßröhrchen für  $\beta$ -Counter (Beckmann Instruments GmbH, München)  
 Ready-Protein Szintillationsflüssigkeit (Beckmann Instruments GmbH, München)  
 $\beta$ -Counter Wallac 1409 (EG&G Berthold, Hannover)

Die Zellen wurden mit 50  $\mu\text{l}$ /Napf <sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) markiert und die Platte nochmals für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Proliferierende Zellen bauen auf diese Weise <sup>3</sup>H-Thymidin in ihre DNA ein. Anschließend wurden die Zellen mittels eines automatischen Zellernteegerätes auf Filterpapier überführt, die benetzten Stellen des Papiers ausgestanzt, in Meßröhrchen gegeben und mit Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Im  $\beta$ -Counter ließ sich dann die emittierte  $\beta$ -Strahlung für jeden einzelnen Versuchsansatz in Zerfällen pro Minute (cpm) messen. Sie gilt als Maß für die vorangegangene Proliferation. Bezogen auf die Mediumkontrolle konnte so für jedes Antigen ein Stimulationsindex (SI) berechnet werden, der wie folgt definiert ist:

$$\text{SI} = \text{cpm}_{\text{Antigenansatz}} : \text{cpm}_{\text{Mediumkontrolle}}$$

Der SI ist somit ein Maß für die Reaktivität der PBMC gegenüber dem jeweiligen Antigen. Wie von Räsänen beschrieben (*Räsänen 1992*), wurde auch in dieser Arbeit ein SI >3,5 als positives LTT-Ergebnis gewertet.

## 2.4 Gewinnung von Lymphozyten aus Dermis und Epidermis

Material:

Hautbiopsiestanze (Stiefel, Offenbach)

Lokalanästhetikum Mepivacain 1% (Curasan® Pharma GmbH, Kleinostheim)

Hanks Puffer, ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Phenolrot (Seromed, Berlin)

Dispase 2,4 U/ml aus *Bacillus polymyxa* (Boehringer Mannheim)

Collagenase H aus *Clostridium histolyticum* (Boehringer Mannheim)

Hyaluronidase Typ I-S, fest, 290 U/mg (Sigma Chemical, Deisenhofen)

DNase I aus bovinem Pankreas (Boehringer Mannheim)

Fötale Kälberserum (FCS) (Greiner, Frickenhausen)

Steriler Nylongazefilter, 40 µm Porengröße (Becton Dickinson, Heidelberg)

Trypsin Typ III aus bovinem Pankreas (Sigma Chemical)

CD3-Antikörper, (Klon SK-7, Becton Dickinson)

Zur Zellgewinnung aus der Haut wurde 72 Stunden nach der Applikation des Epikutantests aus einer positiven Testreaktion eine Hautstanzbiopsie mit einem Durchmesser von 5 mm in Lokalanästhesie (Mepivacain 1%) entnommen, in Hanks Puffer mit Gentamycin und Hapes zur Blutauswaschung aufbewahrt und anschließend steril weiterverarbeitet. Nach Inkubation der gewonnenen Stanzbiopsien für 16 Stunden bei 4°C in Dispase-Lösung wurde die Epidermis mechanisch von der Dermis getrennt. Die Dermis wurde für 4-5 Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad in Hanks Puffer mit folgenden Zusätzen inkubiert: Collagenase H (1 µg/ml), Hyaluronidase (1 µg/ml), DNase (20 µg/ml), Dispase (1,2 U/ml), fötales Kälberserum (FCS, 10%) (*Ramb-Lindhauer 1991*). Die so behandelte Dermis wurde mechanisch zerkleinert, in Suspension gebracht und durch einen sterilen Nylongazefilter doppelt filtriert. Die gewonnene Zellsuspension wurde in mehreren Zentrifugationsschritten gewaschen. Die Epidermis wurde in Trypsinlösung (0,25%) bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, in den letzten 3 Minuten unter Zusatz von DNase (0,05%). Nach der Zugabe von FCS (50%) erfolgte die mechanische Trennung und Filtration der Zellen und anschließend drei Waschgänge.

Die Vitalität der suspendierten Zellen ließ sich durch eine Eosinfärbung ermitteln und lag in allen Fällen über 90%. Der Anteil der T-Zellen in den Zellsuspensionen wurde mittels der indirekten Immunperoxidase-reaktion mit einem CD3-Antikörper bestimmt. Er lag im Blut zwischen 75 und 85%, in der Dermis zwischen 35 und 60% und in der Epidermis zwischen 1 und 7%.

## 2.5 Herstellung von T-Zellklonen aus Blut und Haut

### Material:

24-Napf-Kulturplatten mit Deckel (Nunc, GmbH, Wiesbaden)

autologe Antigen-präsentierende Zellen (APC),  $2 \times 10^5$  Zellen /Napf

$\gamma$ -Cell 2000 (Cäsiumquelle  $^{37}$  Cs) zur Bestrahlung der APC mit 55 Gy Nickelsulfat

Hausstaubmilbenextrakt (Der.p.) 3  $\mu$ g/ml (SB Smith Kline Beecham Pharma, München)

Phytohämagglutinin (PHA) (M-Form, Gibco Life Technologies, Hamburg)

Kulturmedium: LTT-Medium wie unter 2.1. beschrieben + rekombinantes IL-2

(10 U/ml, Becton Dickinson, Heidelberg)

Nach Einholung des zustimmenden Votums 976 vom Juni 1994 durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover konnte mit der Herstellung von T-Zellklonen aus Blut und Haut begonnen werden. Hierfür wurden die aus Blut und Haut gewonnenen Lymphozyten in mittleren Konzentrationen von 500, 250, 100, 50, 25 und 12,5 Zellen/Ansatz eingesetzt. In 96-Napf-Mikrokulturplatten wurden 48 bis 96 Mikrokulturen pro Antigen und Zellkonzentration angelegt. Ein Teil der gewonnenen peripheren PBMC wurde mit 55 Gy bestrahlt und anschließend als autologe Antigen-präsentierende Zellen (APC) in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/Ansatz eingesetzt. Als Antigene dienten Nickelsulfat (Konzentration  $10^{-4}$  M) und Dermatophagoides pteronyssinus (Der.p.) (3  $\mu$ g/ml). Alle Zellen und Antigene wurden in Kulturmedium aufgenommen und am 7. Tag der Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> nochmals mit 50  $\mu$ l Kulturmedium versorgt. Eine mikroskopische Beurteilung der Mikrokulturen erfolgte nach 14 Tagen Inkubation im Brutschrank. Als positiv wurden Kulturen gewertet, die mehr als 50 Blasten enthielten. Aus den Kulturansätzen mit den niedrigsten Zellkonzentrationen, in denen sich ein Wachstum zeigte, wurden Mikrokulturen entnommen, in 24-Napf-Kulturplatten überführt und sofort mit 700  $\mu$ l Kulturmedium, rekombinantem IL-2 (10 U/ml) und Phytohämagglutinin (PHA, 10  $\mu$ g/ml) versorgt.

## 2.6 Expansion der T-Lymphozyten in Zellkulturen, Kryokonservierung

Material:

allogene, mit 55 Gy bestrahlte PBMC als sogenannte „Feederzellen“

Kulturmedium wie unter 2.5 beschrieben

ISCOVE-Basismedium wie unter 2.1. beschrieben

Cryo Vial, Einfrierröhrchen, 2 ml mit Außengewinde (Greiner, Frickenhausen) bovines Serumalbumin (Sigma, München)

Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt)

Die etablierten T-Zellklone in den 24 Loch-Platten wurden in 14-tägigem Abstand mit PHA (10 µg/ml), Kulturmedium (LTT-Medium + IL-2) und bestrahlten allogenen PBMC ( $10^6$ /Napf) versorgt. Diese sogenannten „Feeder“-Zellen waren für die Langzeitkultur von T-Zellen durch die Bereitstellung von zahlreichen Mediatoren und Wachstumsfaktoren sowie Zell-Zell-Kontakten notwendig. Alle zwei Tage wurde das Wachstum der Zellen mikroskopisch beurteilt. Kulturen, in denen sich eine deutliche Proliferation zeigte, wurden auf mehrere Näpfe expandiert, um die nachfolgenden Untersuchungen (Antigenreaktivität, Lymphokinsekretionsmuster, Phänotypisierung) durchführen zu können.

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in ISCOVE-Basismedium unter Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA, 1%) und von Dimethylsulfoxid (DMSO, 10%) bei Zellkonzentrationen von  $1-3 \times 10^6$ /ml, um Zellschäden durch den Einfriervorgang zu vermeiden. Zur größtmöglichen Schonung der Zellen erfolgte das Einfrieren stufenweise bei  $-20^\circ\text{C}$ ,  $-80^\circ\text{C}$  und erst dann in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ .

## 2.7 Frequenzanalyse der kultivierten Lymphozyten

Mittels der Grenzwertverdünnungsmethode (sogenannte „Limiting Dilution Methode“) läßt sich die Frequenz, d.h. der Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtheit der gewonnenen Zellen berechnen (Keystone 1993, Lefkovits 1984). Man geht davon aus, daß Proliferation nur in Mikrokulturen stattfindet, in denen mindestens eine reaktive Zelle enthalten ist. Da nur bei nichtproliferierenden Kulturen eine Aussage über die Anzahl der reaktiven Zellen möglich ist ( $T_{\text{reaktiv}} = 0$ ), gehen nur diese in die Berechnung ein. Der Null-Term der Poisson-Verteilung

$$F_0 = e^{-u},$$

wobei

$u$  = Frequenz der reaktiven Zellen in der untersuchten Zellpopulation und

$F_0$  = Anteil der nicht reaktiven Kulturen an der Gesamtzahl der Kulturen ist,

beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Anteil nicht reaktiver Kulturen pro untersuchter Zellkonzentration und der Frequenz proliferierender Zellen. Es resultiert ein lineares Verhältnis zwischen der Anzahl der Zellen pro Kultur und dem semilogarithmisch aufgetragenen Anteil nicht reaktiver Kulturen an der Gesamtzahl der Kulturen. Die so definierte Gerade erlaubt gleichzeitig eine Kontrolle über das Versuchsprotokoll, d.h. über die Fähigkeit des Systems, tatsächlich nur die Aktivität eines einzelnen limitierenden Zelltyps zu messen. Umgeformt nach

$$u = -\ln F_0$$

kann die Frequenz der Antigen-reaktiven Zellen direkt berechnet werden. Die statistische Analyse erfolgte anhand der Chi-Quadrat-Methode nach Taswell (Taswell 1981) mittels eines hierfür entwickelten Statistikprogrammes (Strijbosch 1988). Die im Ergebnisteil angegebenen Frequenzen proliferierender Zellen beziehen sich stets auf den T-Zellanteil, der vor dem Start der Kulturen immunzytochemisch bestimmt wurde.

Zur Berechnung der Zytokinexpression der T-Zellklone wurde der t-Test bei normal verteilten Stichproben verwendet. Bei nicht normal verteilten Stichproben oder bei niedrigen Fallzahlen wurde zur Ermittlung des statistischen Signifikanzniveaus  $p$  der Mann-Whitney-U-Test verwendet.



## 2.8 Antigen-spezifische Proliferationstests

Frühestens 7 Tage nach Expansion der proliferierenden TCC wurde deren Restimulierbarkeit durch die verwendeten Antigene getestet. Die Zellen wurden zur Entfernung des IL-2 dreimal mit ISCOVE-Basismedium gewaschen und in LTT-Medium in einer Konzentration von  $1,3 \times 10^5$  pro Ansatz in 96-Napf-Rundbodenplatten gegeben. Autologe, bestrahlte PBMC, die als APC dienten, wurden in einer Konzentration von  $7,5 \times 10^4$  pro Ansatz zugesetzt. Nickelsulfat wurde in Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M und Der.p. als Kontrollantigen in einer Konzentration von  $3 \mu\text{g/ml}$  untersucht. Nach 5-tägiger Inkubation wurden die Ansätze wie beim LTT mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert und der Thymidineinbau im  $\beta$ -Counter bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf Dreifachwerten. Eine Nickelreaktivität wurde angenommen, wenn der Stimulationsindex für Nickelsulfat  $> 3,5$  und gleichzeitig der Stimulationsindex für Der.p.-Antigen  $< 3,5$  war.

## 2.9 Hemmung der spezifischen Proliferation durch anti-HLA-DR-Antikörper

Material:  
anti-HLA-DR-Antikörper Klon L243 (Becton Dickinson, Heidelberg)

Um auszuschließen, daß der in den unter 2.3 beschriebenen Untersuchungen gemessene  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau auf einer unspezifischen Stimulation durch das Antigen beruht und nicht auf Antigenpräsentation durch APC und Erkennung des MHC-assoziierten Antigens durch den T-Zellrezeptor (TCR), wurde CD4 positiven PBMC einerseits Antigen, aber keine APC, andererseits Antigen, APC und zusätzlich anti-HLA-DR-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben.

## 2.10 Phänotypisierung der T-Zellklone (TCC)

### Material:

Blockpuffer: 100 µg/ml hitzeaggregiertes, humanes Immunglobulin, 0,2% Gelatine, 20 mM NaN<sub>3</sub> in Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin)

Waschpuffer: 0,2% Gelatine, 20 mM NaN<sub>3</sub> in PBS

Fixierlösung: Paraformaldehyd 0,5% in PBS

96-Napf Rundbodenplatten mit Deckel (Nunc GmbH, Wiesbaden)

Immunfluoreszenzantikörper:

anti-TCR-2 α/β, Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)-konjugiert (Becton Dickinson, Heidelberg)

anti-CD4 (Leu-3a), Peridin-Chlorophyll-Protein-Reagenz(PeRCP)-konjugiert (Becton Dickinson, Heidelberg)

anti-CD8, Phycoerythrin(PE)-konjugiert (Immunotech, Hamburg)

selbstklebende Abdeckfolien für Mikrokulturplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden)

FACScan<sup>®</sup>, Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg)

PCLysys, Computerprogramm zur Auswertung der Durchflußzytometrie (Becton Dickinson, Heidelberg)

Zur Verifizierung der T-Zellidentität und Zuordnung der Klone zum CD4+ oder CD8+ Phänotyp wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 50 µl Blockpuffer aufgenommen und in 96-Napf-Rundbodenplatten mit monoklonalen Antikörpern gegen das CD4-Antigen (PeRCP-konjugiert), das CD8-Antigen (PE-konjugiert) und das CD3-Antigen (FITC-konjugiert) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 150 µl Waschpuffer je Ansatz gewaschen und jeweils für 10 Minuten mit 200 x g zentrifugiert, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem letzten Waschgang erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehydlösung. Im Durchflußzytometer wurden dann Größe und Granularität der Zellen bestimmt und die Intensität der drei Immunfluoreszenzfarbstoffe gemessen. Bei Mehrfachfluoreszenzen wurde zuvor anhand einer einfach markierten Zellprobe die Konzentration optimal eingestellt. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm PCLysys.

## 2.11 Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA

### Material:

Concanavalin A, Typ IV-S aus *Canavalia ensiformis* (Sigma, Deisenhofen)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml

Biotrak, ELISA zur Messung von IL-4 (Amersham Buchler GmbH + Co KG, Braunschweig)

enthält: 96-Napf-Mikrotiterplatte, mit murinem anti-IL-4- Antikörper beschichtet

IL-4-Konjugat: Peroxidase-konjugierter, polyklonaler anti-IL-4-Antikörper

IL-4 Standard: lyophilisiertes, rekombinantes, humanes IL-4

Verdünnungen und Puffer wie vom Hersteller angegeben

Farbreagenz A: 12,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Farbreagenz B: 12,5 ml Tetramethylbenzidin

Stopreagenz: 6 ml 1 molare Schwefelsäure

HBDO3M, ELISA zur Messung von IFN- $\gamma$  (Laboserv, Giessen)

enthält: 96 Mikrotiternäpfe in 12 Streifen, mit anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper beschichtet

Rahmen für Mikrotiter-Streifen

IFN- $\gamma$ -Standard: humanes IFN- $\gamma$  in 5 Konzentrationen von 0 bis 5000 pg/ml in

Phosphatpuffer, gefriergetrocknet

Biotin-konjugierter anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper in Phosphatpuffer

Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat in Phosphatpuffer

Substrattabletten: 4 x 5mg Paranitrophenylphosphat

4 Abdeckfolien

Verdünnungen und Puffer wie vom Hersteller angegeben

Zur näheren Charakterisierung der etablierten TCC wurde ihre Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-4 (IL-4) untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Klone mit dem Mitogen Concanavalin A (Con A) stimuliert und die Zytokine in den Kulturüberständen gemessen.

Frühestens am 7. und spätestens am 10. Tag nach Feedergabe wurden Zellen aus den Kulturen entnommen, dreimal mit ISCOVE-Basismedium gewaschen und in ISCOVE-Basismedium +10% FCS in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz in 24-Napf-Kulturplatten gegeben, wobei von jedem Klon zwei Ansätze angelegt wurden. Die Konzentration des Con A betrug 10  $\mu$ g/ml. Kulturen ohne Con A dienten als Kontrolle. Die Überstände wurden nach 24 Stunden (zur IL-4-Messung) bzw. 48 Stunden (zur IFN- $\gamma$ -Messung) abgenommen und 10 Minuten bei 1530 x g in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Im Überstand wurde mittels ELISA entsprechend den Anweisungen der Hersteller der Gehalt an IL-4 bzw. IFN- $\gamma$  gemessen. Dabei wurden die Zytokine an die mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Platte gebunden. Nicht gebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Nach Bindung von enzymkonjugierten anti-IL-4- bzw. anti-IFN- $\gamma$ -Antikörpern wurden entsprechende Substratreaktionen, die zur Änderung der optischen Dichte führten, durchgeführt. Anhand einer Standardkurve konnte der Gehalt an IL-4 und IFN- $\gamma$  bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen lagen für IL-4 bei 31,3 pg/ml und für IFN- $\gamma$  bei 20 pg/ml, die meßbaren Höchstmengen für IL-4 bei 2000 pg/ml und für IFN- $\gamma$  bei 5000 pg/ml. Überstände mit höheren Zytokinkonzentrationen wurden vorverdünnt, bevor die Tests nochmals durchgeführt wurden.

## 2.12 Messung intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie

Material:

Fixierlösung: Paraformaldehyd 0,5% in PBS

Permeabilisierungspuffer (PBS + 0,1% Saponin) (Riedel de Haen, Seelze)

Mitogene: Phorbolster, Ca-Ionophor, Brefeldin, Ionomycin

Phosphatpuffer (PBS)

FACScan<sup>®</sup>, Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg)

Cellquest Software PCLysys, Computerprogramm zur Auswertung der Durchflußzytometrie (Becton Dickinson, Heidelberg)

Die Zellen wurden geerntet, zweimal in PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit 4%igem eisgekühltem Phosphat-gepuffertem Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Um eine Diffusion der Färbe-Antikörper durch die Membranen zu ermöglichen, wurden die Zellen 15 Minuten in PBS mit 0,1%igem Saponin permeabilisiert. Danach wurden vortitrierte monoklonale Zytokin-spezifische Antikörper, in Permeabilisierungspuffer (PBS-Saponin) gelöst, hinzugefügt und 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Jeweils ein Versuchsansatz wurde zusätzlich mit den Mitogenen Phorbolster, Ionomycin, Brefeldin und Ca-Ionophor stimuliert, der andere blieb unstimuliert. Nach mehreren Waschvorgängen in Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen resuspendiert und in PBS aufgenommen, um anschließend im Durchflußzytometer bestimmt zu werden. Die Ergebnisse wurden mittels spezifischer Software ausgewertet.

## 2.13 CD4/ CD8 Selektion über Beads

Material:

MiniMACS Separationssystem (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach)

enthält: MiniMacs Separator (Hochenergie-Permanentmagnet) Stahlständer zur variablen Anbringung der Separatoren

Sep-Units

Trennsäulen, Typ MS

Flow-resistor Kanülen

MACS Puffer (1l PBS + 26 ml EDTA 0,2M + 5 g BSA)

Murine Primärantikörper gegen CD4, CD8 und CD12 (Workshop Antikörper: CD4 (6T-010) m IgG1, CD8 (6T-036) m IgG2b (Tokyo, Japan)

MACS Microbeads (Goat anti-mouse IgG (H+L-Microbeads), 1ml ( $\approx 5 \times 10^8$  Zellen))

Steriler Nylongazefilter, 0,2  $\mu$ m Porengröße (Becton Dickinson, Heidelberg)

PBMC wurden in 2 Ansätzen zu je  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml MACS Puffer aufgenommen. Nach Sterilfiltration der Antikörper wurde ein Ansatz zunächst mit 100  $\mu$ l CD14 Primärantikörper versehen, um die CD4 exprimierenden Monozyten zu depletieren. Anschließend wurden 100  $\mu$ l CD8-Antikörper (1:300 vorverdünnt) zur Depletion der Suppressorzellen und Isolierung von T-Helferzellen hinzugefügt. Dem anderen Ansatz wurde 100  $\mu$ l CD4-Antikörper zugegeben, um die Helferzellen zu depletieren und Suppressorzellen zu isolieren. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C auf Eis. In zwei weiteren Waschvorgängen mit 5 ml MACS Puffer wurden nicht gebundene Antikörper herausgewaschen,  $1 \times 10^7$  Zellen in 80  $\mu$ l Puffer aufgenommen und 20  $\mu$ l MACS Microbeads zugegeben. Während der 15-minütigen Inkubation bei 4°C auf Eis hefteten sich die Microbeads Magnetpartikel an die bereits an PBMC gebundenen Antikörper. Auch hier wurden nicht gebundene Microbeads in zwei Waschgängen herausgewaschen, bevor die markierten Zellen in 500  $\mu$ l Puffer aufgenommen wurden.

Nach dem Anheften der Sep-Units an den Stahlständer wurden die Flow-resistor Kanülen auf die Säulen gesteckt und mit 500  $\mu$ l MACS Puffer vor der Separation gewaschen. Diese Suspension wurde verworfen und nun die magnetisch markierten Zellsuspensionen in jeweils eine Säule gegeben und mit 500  $\mu$ l Puffer nachgespült. Dabei blieben die markierten Zellen im Separator haften (positive Fraktion), die nicht markierten Zellen passierten die Säule (negative Fraktion). Nach dem Entfernen der Kanüle wurde die Säule 2-3 mal nachgespült (Waschfraktion).

Für weitere Versuche wurde nur die negative Fraktion verwendet, nachdem mittels Durchflußzytometrie (wie unter 2.10 beschrieben) der Phänotyp kontrolliert wurde.

## 2.14 Gewinnung von dermalen und epidermalen Zellen aus Haut

### Material:

sterile Petrischalen (Nunc GmbH, Wiesbaden)

Probenröhrchen 50 ml, steril, mit Schraubverschluß (Greiner GmbH, Frickenhausen)

Schere, Pinzette (autoklaviert)

Teesieb (autoklaviert)

100 ml Becherglas (autoklaviert)

Sieb Falcon Cell Strainer

Sterilfilter 0.8, 0.45, 0.2 µm Porengröße (Becton Dickinson, Heidelberg) hintereinander auf steriler Spritze

Medium Haut: MEM-Earle w o. 85 g/l NaHCO<sub>3</sub> 500 ml

Enzyme wie unter 2.4 beschrieben

Für die Gewinnung dermalen und epidermalen Zellen aus gesunder Haut wurden Hautlappen von kosmetischen Mamma-Reduktionsplastiken, welche sonst verworfen worden wären, aus der Abteilung für Gynäkologie des Krankenhaus Nordstadt verwendet.

Um Haut in Epidermis und Dermis zu trennen und daraus Zellen zu eliminieren, ist eine sorgfältige Aufspaltung notwendig. Hierfür wurde ein gesunder Hautlappen von ca. 20 g gründlich in Medium gespült, um Blutreste zu entfernen. Das Unterhautfettgewebe und blutige Ränder wurden abgetrennt, das Gewebe zerkleinert und über Nacht in einer Petrischale in Dispase inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis von der Dermis vorsichtig getrennt und beide Fraktionen in Hanks-Hepes-Genta gelagert.

Für die Weiterverarbeitung der Dermis wurde aus 0,015 g Kollagenase pro g Gewebe und 0,0075 g Hyaluronidase pro g Gewebe ein Enzymgemisch in 2-facher Ausfertigung hergestellt, dieses in Hautmedium gelöst und im 3-fach Filter steril filtriert. Die zerkleinerte Dermis wurde nun 2-3 h bei 37°C auf einem Rüttler im Enzymgemisch inkubiert.

Während dieser Zeit konnte die abgetrennte Epidermis weiter bearbeitet werden. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 20-30 Minuten im Brutschrank in einer Lösung aus 12,5 mg Trypsin in 5-15 ml Hanks-Hepes-Genta (sterilfiltriert) wurde die Epidermis mit Hilfe von Schere und Pipette noch weiter zerkleinert. Nach Zugabe von 10 ml FCS wurde die Suspension über ein Sieb gegeben, um größere Bestandteile zu entfernen. Das Filtrat wurde nach dem Abzentrifugieren nochmals gewaschen. Die somit gewonnenen epidermalen Zellen konnten nun kultiviert werden.

Nach 2-3 h Wärmeinkubation der Dermis wurde das nun angedaute Gewebe durch ein steriles Teesieb in ein Becherglas überführt und die Flüssigkeit durch Rühren im Sieb vom Gewebe getrennt. Das Filtrat wurde durch das Sieb eines Cell Strainers gegeben und anschließend abzentrifugiert. Nach einem weiteren Waschgang wurden die dermalen Zellen in Medium aufgenommen. Die im Sieb verbliebenen Gewebereste wurden mit der Schere nochmals gut zerkleinert und mit frischer Enzymlösung erneut für 2-3 h im Brutschrank versetzt. In einem

zweiten Durchgang wurde mit den nochmals zerkleinerten Zellen ebenso fortgeföhren wie oben beschrieben, zuletzt wurden auch sie in Medium aufgenommen.

## 2.15 Kokultivierung von T-Lymphozyten mit dermalen und epidermalen Zellen

Material:

4 ml-Napf-Kulturplatte mit Deckel (Nunc GmbH, Wiesbaden)

96-Napf-Rundbodenplatte mit Deckel (Nunc GmbH, Wiesbaden)

ISCOVE-Basismedium: 15 mg/l Phenolrot; 3,024 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne L-Glutamin (Seromed, Berlin)

Probenröhren 50 ml, steril, mit Schraubverschluß (Greiner GmbH, Frickenhausen)

Objektträger, Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm<sup>2</sup> (Neubauer-Improved, Jürgens, Hannover)

NiSO<sub>4</sub>-Lösung 5% in ISCOVE-Basismedium (Brial Allergen GmbH, Greven)

IFN- $\gamma$  1000U/ml

Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)

Im folgenden Versuchsansatz sollten kultivierte TCC mit frisch isolierten dermalen oder epidermalen Zellen aus gesunder Haut über einige Tage kokultiviert und anschließend die Effekte auf das Zytokinmuster im Durchflußzytometer bestimmt werden.

Die durch Hautaufarbeitung (s. 2.14) gewonnen dermalen Zellen und Keratinozyten wurden für 2 Tage in 4 ml Napfplatten in LHC-Medium kultiviert. 48 h vor der Kokultivierung wurden die Keratinozyten mit IFN- $\gamma$  versetzt. Nach dieser Vorstimulation wurden die Ansätze gewaschen, um das IFN- $\gamma$  zu entfernen und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Auch bei den TCC mit bekanntem Zytokin- und V $\beta$ -Muster aus der Kultur wurden die Zellzahlen bestimmt. Anschließend wurden die TCC mit einer gleichen Anzahl dermalen oder epidermalen Zellen versetzt. Alle Ansätze wurden 2-fach à 150  $\mu$ l angefertigt, um für die Messung der intrazellulären Zytokine später 300 $\mu$ l zur Verfügung zu haben. Von jedem Klon wurden Ansätze mit jeweils ausschließlich Medium, Keratinozyten, dermalen Zellen, Nickelsulfat und dem TCR-äquivalenten Superantigen angefertigt. Ein weiterer Ansatz enthielt sowohl Nickelsulfat als auch dermale oder epidermale Zellen, ein anderer neben Superantigen entweder dermale oder epidermale Zellen. In Kontrollansätzen wurden Keratinozyten und dermale Zellen ohne TCC kultiviert. Die Versuchsansätze wurden anschließend durchschnittlich 3 Tage inkubiert, bevor sie der Messung intrazellulärer Zytokine zugeführt wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Methodische Vorversuche

##### 3.1.1 Nachweis einer Nickel-allergischen Reaktion in vitro

Zur Validierung des Testsystems wurden im Lymphozytentransformationstest (LTT) frisch isolierte Blutzellen (PBMC) von atopischen Patienten untersucht, die im Epikutantest (in vivo) auf Nickel, nicht jedoch auf Kobalt, positiv reagiert hatten. Tabelle 1 zeigt exemplarisch ein Ergebnis. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus einem Stichprobenumfang von 6 Proben und die Standardabweichung. NiSO<sub>4</sub> (Nickelsulfat) und CoCl<sub>2</sub> (Kobaldchlorid) wurden in den Konzentrationen 10<sup>-4</sup>M und 10<sup>-5</sup>M verwendet. Phytohämagglutinin (PHA) diente als Positivkontrolle. Der Stimulationsindex berechnet sich aus dem Quotienten von cpm im Testansatz zu cpm in der Negativkontrolle. Von Nickelreaktivität konnte bei einem Stimulationsindex über 3,5 ausgegangen werden. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1**  
**LTT auf Nickelsulfat und Kobaltchlorid**

Allergen	Proliferation (Thymidineinbau,cpm)			Stimulationsindex (SI)
Phosphatpuffer (Negativ-Kontrolle)	489,4	+/-	237,7	1,0
PHA (10 µg/ml)	33116,0	+/-	8046,8	67,6
Nickelsulfat (10 <sup>-4</sup> M)	2107,5	+/-	403,4	4,3
Nickelsulfat (10 <sup>-5</sup> M)	2009,1	+/-	853,7	4,1
Cobaltchlorid (10 <sup>-4</sup> M)	327,1	+/-	199,5	0,7
Cobaltchlorid (10 <sup>-5</sup> M)	529,9	+/-	246,7	1,1

Für beide Konzentrationen (10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup> M) Nickelsulfat lag der Stimulationsindex über 4, nicht aber für Kobaltchlorid. Somit konnte die im Epikutantest gewonnene positive Reaktion auf Nickelsulfat im LTT bestätigt werden.



### 3.1.2 Kinetische Bestimmung von sezerniertem IFN- $\gamma$ durch stimulierte TCC

Unter der Fragestellung, welche Inkubationszeit zur Bestimmung von IFN- $\gamma$  in TCC optimal ist, wurde dieses Zytokin im Überstand von CD4+ und CD8+ Nickel-spezifischen TCC zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Nach 2 und 4 Stunden und nach 1 und 2 Tagen wurde IFN- $\gamma$  im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, daß in Anwesenheit von Nickelsulfat und Concanavalin A nach einer Inkubationszeit von 1 Tag die maximale IFN- $\gamma$  Sekretion zu beobachten war (Tabelle 2). In den folgenden Untersuchungen wurde (wenn nicht anders angegeben) daher eine Inkubationszeit von 1 Tag eingehalten.

**Tabelle 2**  
Kinetische Bestimmung von IFN- $\gamma$  durch TCC

TCC	Kulturbedingungen	2h	4h	1d	2d
CD4+	Medium	218	625	392	0
CD4+	Nickelsulfat	226	260	1000	378
CD8+	Medium	0	0	38	0
CD8+	Nickelsulfat	0	0	150	49

Konzentration von IFN- $\gamma$  (in ng/ml) im Überstand von CD4+ bzw. CD8+ TCC (wie unter 2.11 beschrieben) nach 2 Stunden (2h), 4 Stunden (4h), 1 Tag (1d) und 2 Tagen (2d)

### **3.2 Einfluß des Kompartiments auf die Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten bei Nicht-Atopikern**

Nickel-spezifische TCC aus Epikutantest-Reaktionen sezernierten z. T. hohe Konzentrationen von IL-4 (*Werfel 1997a*). Um auszuschließen, daß dieser Befund auf einen in-vitro Artefakt aufgrund der kompakten Kulturbedingungen zurückzuführen war, wurde die spontane Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  durch Lymphozyten aus Blut und Epikutantest-Reaktionen mittels FACS- Analyse untersucht.

Hierbei ließ sich bestätigen, daß IL-4 in einer Subpopulation von CD3+ T-Zellen aus der Haut nachweisbar war, die nach in vitro Stimulation mit Mitogenen noch größer wurde. Blutlymphozyten exprimierten dagegen nahezu kein IL-4 ohne in vitro Stimulation bzw. nur wenig IL-4 nach Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor über 5 Stunden (Abbildung 1).

Anders verhielt es sich mit IFN- $\gamma$ . Dieses war nur bei sehr wenigen CD3+ T-Zellen aus der Haut nachweisbar, welche sich aber nach kurzer in vitro Stimulation zu einer erhöhten Expression anregen ließen. Frische Blutlymphozyten exprimierten ebenfalls nahezu kein IFN- $\gamma$ . Nach Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor allerdings zeigten nahezu die Hälfte der CD3+ Blutlymphozyten eine Expression dieses Zytokins, das damit deutlich über der Expression von IL-4 lag (Abbildung 2).

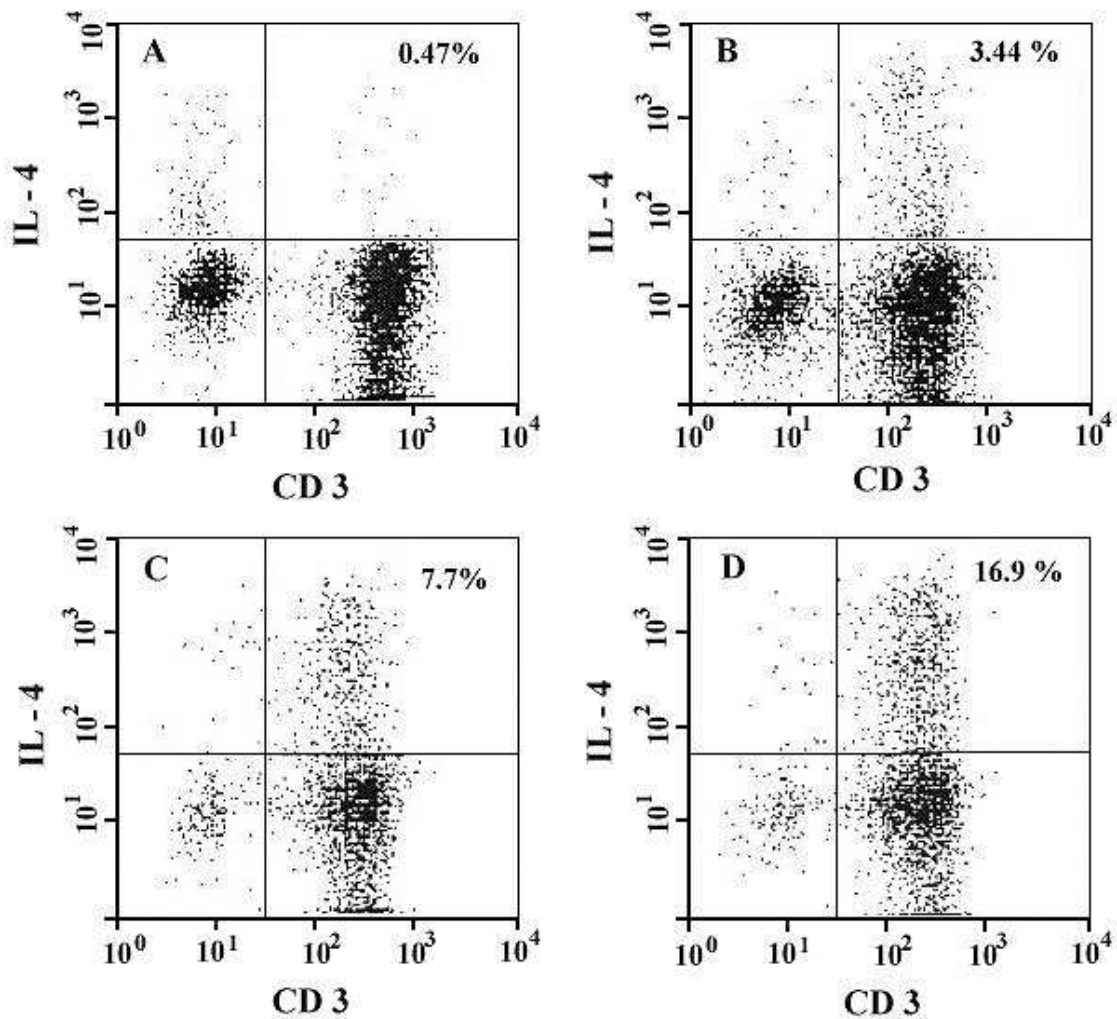


Abbildung 1

### IL-4 Expression in CD3+ T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis

Durchflußzytometrische Darstellung nach Färbung von permeabilisierten Zellen mit anti-Zytokin und CD3-Antikörpern. Im oberen Quadranten befindet sich die Anzahl sowohl CD3+ als auch IL-4+ Lymphozyten (in %) bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Lymphozyten.

- A) PBMC ohne in vitro Stimulation
- B) PBMC nach in vitro Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor über 5 Stunden
- C) Lymphozyten aus einer Epikutantest-Läsion ohne weitere in vitro Stimulation
- D) Lymphozyten aus einer Epikutantest-Läsion, die zusätzlich in vitro mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor über einen Zeitraum von 5 Stunden stimuliert wurden

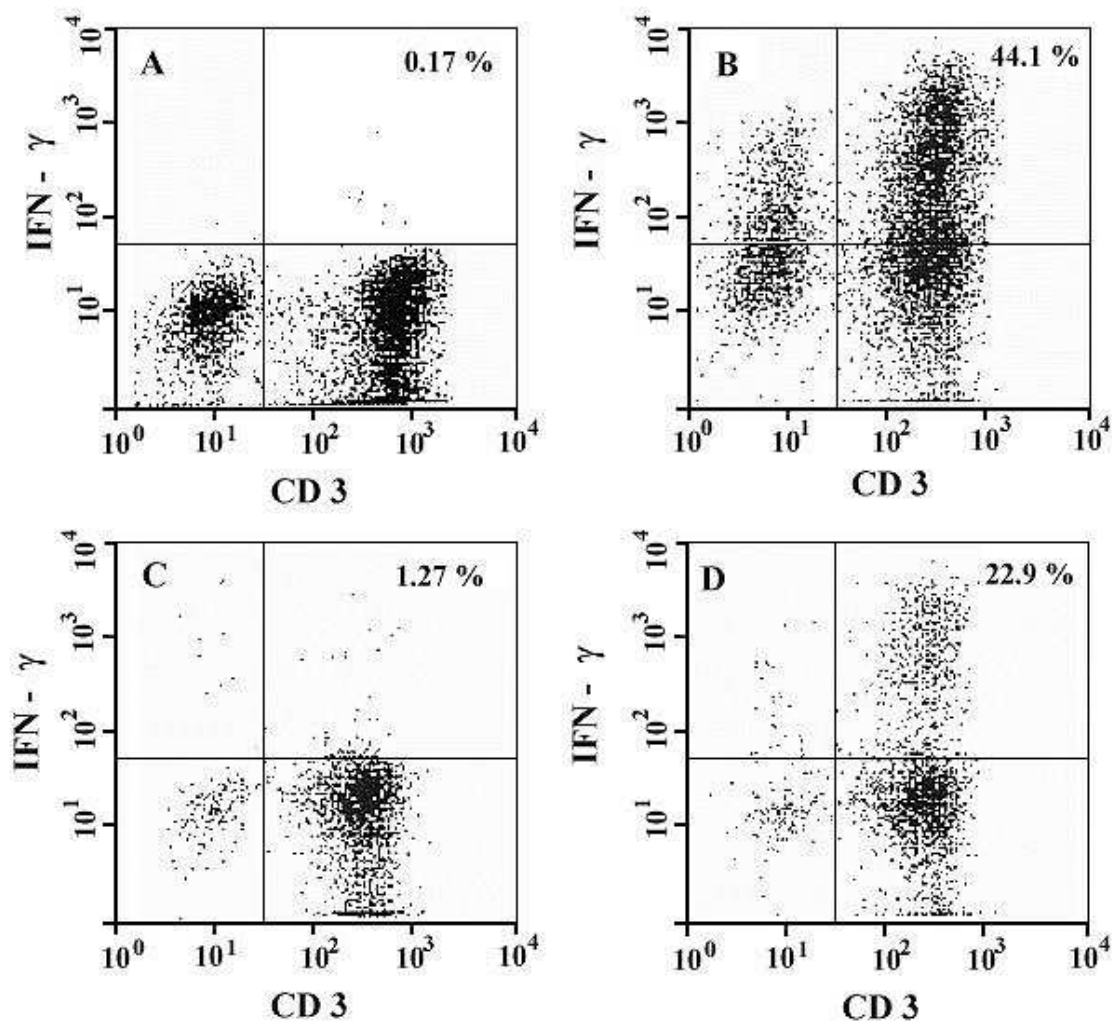


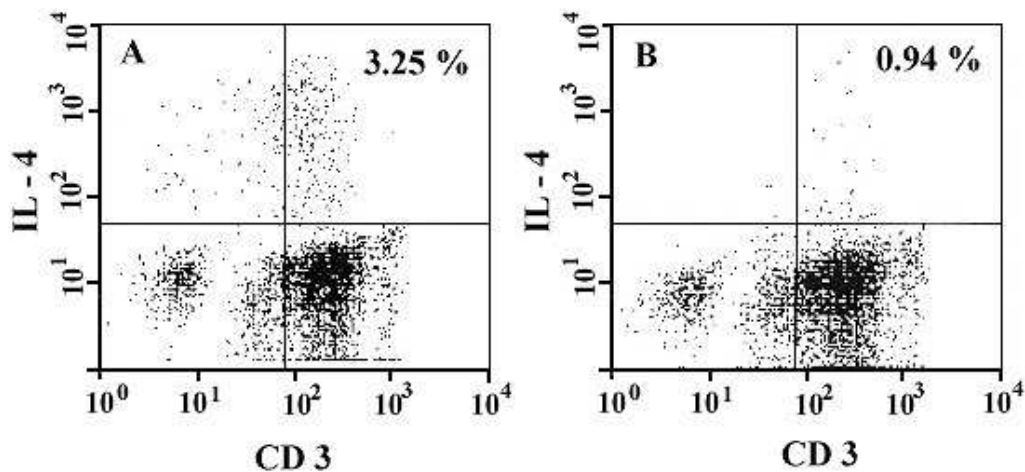
Abbildung 2

### IFN- $\gamma$ Expression in CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis

Durchflußzytometrische Darstellung nach Färbung von permeabilisierten Zellen mit anti-Zytokin und CD3-Antikörpern. Im oberen Quadranten befindet sich die Anzahl sowohl CD3<sup>+</sup> als auch IL-4<sup>+</sup> Lymphozyten (in %) bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Lymphozyten.

- A) PBMC ohne in vitro Stimulation
- B) PBMC nach in vitro Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor über 5 Stunden
- C) Lymphozyten aus einer Epikutantest-Läsion ohne weitere in vitro Stimulation
- D) Lymphozyten aus einer Epikutantest-Läsion, die zusätzlich in vitro mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor über einen Zeitraum von 5 Stunden stimuliert wurden

Um eine Beeinflussung des Nachweises von intrazellulärem IL-4 durch unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurden durchflußzytometrische Untersuchungen nach Färbung von permeabilisierten Zellen mit anti-Zytokin und CD3-Antikörpern durchgeführt, wobei im Vergleichsansatz anti-IL-4 über eine Stunde lang vor Inkubation mit dem Liganden IL-4 im molaren Verhältnis 1:7 präinkubiert wurde. Die Bindung von anti-IL-4 an Haut-infiltrierende Lymphozyten war spezifisch, da sie durch lösliches IL-4 blockiert werden konnte (Abbildung 3).



**Abbildung 3**

**Spezifische IL-4 Expression in CD3+ T-Lymphozyten eines nicht-atopischen Patienten mit Nickel-allergischer Kontaktdermatitis**

- A) Bindung von anti-IL-4 an unstimulierte Lymphozyten aus einer Epikutantest-Reaktion
- B) Blockade der Bindung von anti-IL4 durch unmarkiertes IL-4

Tabelle 3 faßt alle Versuchsansätze zusammen, in denen frisch isolierte Lymphozyten aus Epikutantest-Reaktionen gegen Nickel mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor vor der Darstellung intrazellulärer Zytokine präinkubiert wurden, bevor die intrazelluläre Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  gemessen wurde.

**Tabelle 3**

**Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten nicht-atopischer Individuen aus Blut und Epikutantest-Läsionen bei allergischer Kontaktdermatitis**

	<b>IL-4 + T-Zellen</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> + T-Zellen</b>
Epikutantest-Läsionen	13,1 %	22,3 %
Blut	4,0 %	28,7 %

Angegeben ist der gemittelte Anteil (in %) der CD3+ T-Lymphozyten bei 3 Patienten jeweils in Epikutantest-Läsionen bzw. Blut.

Im Ergebnis war nach Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor der Anteil IL-4+ Lymphozyten in der Haut deutlich höher als im Blut (13,1 % gegen 4,0 % und der Anteil IFN- $\gamma$ + Lymphozyten im Blut etwas höher als in der Haut (28,7 % gegen 22,3 %).

### 3.3 Untersuchung des Zytokinmusters in frisch isolierten T-Zellen aus Epikutantest-Reaktionen gegen unterschiedliche Kontaktallergene

Um auszuschließen, daß die IL-4 Expressionen in „akuten“ Läsionen ausschließlich durch Stimulation mit Nickel als Kontaktallergen induziert wurden, wurden die Zytokinmuster von hautinfiltrierenden, frisch isolierten Zellen auch aus Reaktionen ganz unterschiedlicher Kontaktallergene miteinander verglichen (Tabelle 4).

**Tabelle 4**

**Intrazelluläre durchflußzytometrische Messung von IL-4 und IFN- $\gamma$  in frisch isolierten Hautinfiltrierenden Lymphozyten aus Epikutantest-Läsionen bei allergischer Kontaktdermatitis nicht-atopischer Spender**

(wie unter 2.12 im Methodenteil beschrieben)

Kontaktallergen	% IL-4+ T-Zellen	% IFN- $\gamma$ + T-Zellen
Nickelsulfat	7,7	1,3
Kathon CG	6,8	0,1
Quecksilber (organisch)	6,6	1,0
Quecksilber (anorganisch)	10,6	2,5
Sesquiterpenlacton	3,7	0,4
Epoxidharz	8,7	1,8
Thiuram-Mix	6,2	1,3
<b>Durchschnitt</b>	<b>7,2 +/- 2,2</b>	<b>1,2 +/- 0,81</b>

Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung in % der IL-4 positiven bzw. IFN- $\gamma$  positiven T-Zellen

Anti-IL-4 Antikörper banden an eine Subpopulation von 7,2 +/- 2,2 % der permeabilisierten Hautinfiltrierenden Lymphozyten aus Epikutantest-Läsionen ohne zusätzliche in-vitro-Stimulation mit Phorbol ester, Calcium-Ionophor oder anderen Mitogenen. Diese Ergebnisse fanden sich in allen Zellen aus Läsionen, die durch verschiedene Kontaktallergene (z.B. Quecksilber, Nickelsulfat, Chlormethylisothiazolin, Epoxidharz, Sesquiterpenlacton) (Tabelle 4) provoziert wurden. Der zunächst an T-Zellklonen erhobene Befund einer IL-4 Produktion auch bei allergischer Kontaktdermatitis in „akuten Läsionen“ konnte somit auf frisch isolierte Zellen übertragen werden.

### 3.4 Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone aus Epikutantest-Läsionen bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern

Um die Unterschiede im Zytokinmuster Nickel-spezifischer TCC von Atopikern mit denen von Nicht-Atopikern zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit die Expressionen von IL-4 und IFN- $\gamma$  in TCC aus Epikutantest-Läsionen von zwei atopischen Patienten mit bereits vorpublizierten Befunden nicht-atopischer Individuen (*Werfel 1997a und b*) verglichen. Auch wurde bei den atopischen Spendern das Zytokinmuster von TCC aus Epikutantest-Läsionen (Tabelle 5 für IL-4 und Tabelle 6 für IFN- $\gamma$ ), Spontanläsionen, sowie Blut (Tabelle 8) bestimmt und miteinander verglichen.

**Tabelle 5**  
**IL-4 Sekretion von aktivierten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen**

Spender	Quelle der TCC	Anzahl der TCC	IL-4 (ng/ml)	IL-4 (ng/ml) 25%-75% Perzentile
Atopiker	Epikutantest	13	3.70	1.19 – 8.00
Nicht-Atopiker	Epikutantest	56*	1.40	0.81 – 4.40

\* Die 56 TCC von Nicht-Atopikern wurden in einer zuvor durchgeführten Arbeit generiert. Das Zytokinmuster dieser Zellen wurde hier mit dem der 13 neu generierten TCC von Atopikern verglichen.

**Tabelle 6**  
**IFN- $\gamma$  Sekretion von aktivierten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen**

Spender	Quelle der TCC	Anzahl der TCC	IFN- $\gamma$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml) 25%-75% Perzentile
Atopiker	Epikutantest	13	0.00	0.00 – 1.05
Nicht-Atopiker*	Epikutantest	56*	3.20	1.08 – 8.25

\*Die 56 TCC von Nicht-Atopikern wurden in einer zuvor durchgeführten Arbeit generiert. Das Zytokinmuster dieser Zellen wurde hier mit dem der 13 neu generierten TCC von Atopikern verglichen.



Die IL-4 Sekretion von Nickel spezifischen TCC aus der Dermis von Epikutantest-Läsionen atopischer Patienten war signifikant höher als die von nicht-atopischen Spendern ( $p < 0,01$ ).

Im Gegensatz dazu war die IFN- $\gamma$  Sekretion in TCC aus Epikutantest-Läsionen atopischer Spender signifikant niedriger, verglichen mit TCC nicht atopischer Spender ( $p < 0,01$ ).

Basierend auf den Ergebnissen der IL-4 und IFN- $\gamma$  Produktion wurde das Zytokinmuster jedes TCC entweder als Typ 1, Typ 0 oder Typ 2 Muster eingeteilt. Die Grenzwerte, die für die Klassifikation verwendet wurden, waren 1,25 ng/ml IFN- $\gamma$  und 0.25 ng/ml IL-4, was bedeutet, daß eine TCC Sekretion  $> 1.25$  ng/ml IFN- $\gamma$  und  $< 0.25$  ng/ml IL-4 im Überstand als ein Typ 1 Zytokinmuster wie zuvor beschrieben (Sager 1992, Werfel 1996) klassifiziert wurde. Das Ergebnis zeigt Tabelle 7.

**Tabelle 7**  
**Zytokinmuster von Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen**

Spender	Zytokinmuster			
	nicht klassifizierbar <sup>a</sup>	Typ 1 <sup>b</sup>	Typ 0 <sup>c</sup>	Typ 2 <sup>d</sup>
Atopiker	1	1 (7,6%)	1 (7,6%)	10 (76,9%)
Nicht-Atopiker*	1	5 (8,9%)	45 (80,3%)	5 (8,9%)

Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl bzw. der Prozentanteil der zu einem Zytokinmuster gehörigen TCC.

\* Die 56 TCC von Nicht-Atopikern wurden in einer zuvor durchgeführten Arbeit generiert. Das Zytokinmuster dieser Zellen wurde hier mit dem der 13 neu generierten TCC von Atopikern verglichen.

<sup>a</sup> TCC konnten nicht klassifiziert werden, wenn die Konzentrationen sowohl von IFN- $\gamma$  als auch von IL-4 unter dem definierten Grenzwert lagen

<sup>b</sup> Zytokinmuster Typ 1 wurde durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  definiert

<sup>c</sup> Zytokinmuster Typ 0 wurde durch simultane Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 definiert

<sup>d</sup> Zytokinmuster Typ 2 wurde definiert durch die Sekretion von IL-4

Die meisten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen von Atopikern produzierten IL-4 in Abwesenheit von IFN- $\gamma$ , was einem Typ 2 Muster entsprach. Die Mehrheit der TCC von Nicht-Atopikern hingegen produzierte ein gemischtes Bild aus IL-4 und IFN- $\gamma$ , also ein Typ 0 Zytokinmuster.

### 3.5 Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone von atopischen Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis

Unter der Fragestellung, welchen Einfluß die Mikroumgebung auf das Zytokinexpressionsmuster Nickel-spezifischer TCC bei atopischen Individuen hat, wurde die Sekretion von IL-4 und IFN- $\gamma$  von TCC aus Blut und chronischen Hautläsionen (Spontanläsionen) verglichen (Tabelle 8).

**Tabelle 8**  
**Zytokinexpression Nickel-spezifischer TCC atopischer Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis**

	IL-4 (ng/ml)		IFN- $\gamma$ (ng/ml)	
Quelle der TCC	Median	25% - 75% Perzentile	Median	25% - 75% Perzentile
Spontanläsionen (11 Klone)	0,30	0,00 - 3,00	13,20	6,60 - 21,70
Blut (18 Klone)	0,13	0,04 - 0,80	11,20	2,93 - 19,40

Die Sekretionen von IL-4 durch Kontaktallergen-spezifische TCC aus Blut bzw. chronischen Hautläsionen waren bei Atopikern vergleichbar niedrig und lagen damit deutlich unter der IL-4 Sekretion von TCC aus Epikutantest-Läsionen (vgl. Tabelle 5).

Die Sekretionen von IFN- $\gamma$  waren vergleichbar hoch und lagen damit deutlich über der IFN- $\gamma$  Sekretion von TCC aus Epikutantest-Läsionen (vgl. Tabelle 6).

Anders als bei TCC aus Epikutantest-Läsionen war die Sekretion der Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$  von TCC aus Blut und Spontanläsionen somit nicht signifikant unterschiedlich, obwohl hier atopische Individuen miteinander verglichen wurden. Das Muster entsprach somit nicht nur im Blut sondern auch in Spontanläsionen einem Typ 1 Muster, was als Hinweis auf einen Zytokin-Switch von Typ 2 (in „akuten“ Epikutantest-Läsionen) zu Typ 1 (in chronifizierten Spontanläsionen) gedeutet werden kann.

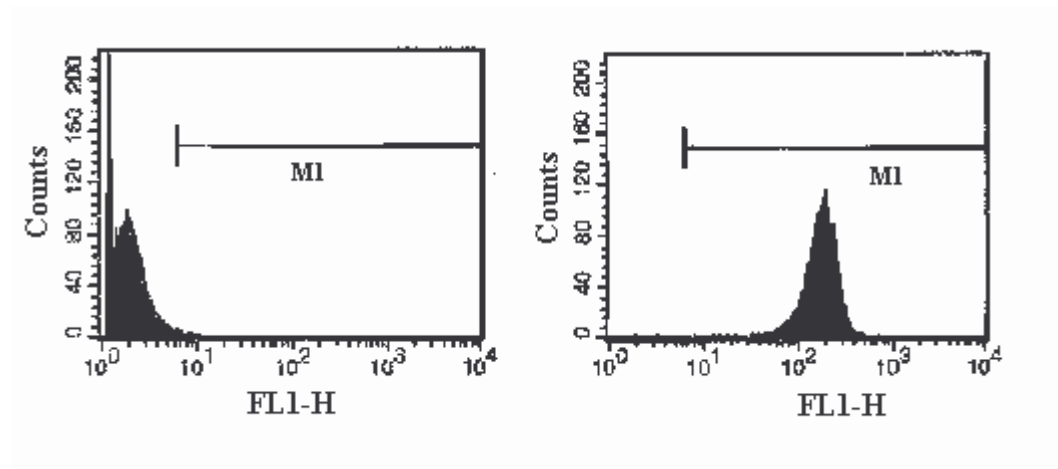
### 3.6 Einfluß des kutanen Mikromilieus auf die Zytokinexpression

Unter der Fragestellung, ob Mikromilieu-faktoren aus Epidermis bzw. Dermis die Zytokinexpression Kontaktallergen-spezifischer T-Zell-Klone beeinflussen können, wurden Nickel-spezifische T-Zell-Klone untersucht, die zwei Tage zusammen mit Zellsuspensionen aus normaler Dermis oder normaler Epidermis kokultiviert wurden. Wenn angegeben, wurde ein direkter Zell-Kontakt zwischen den T-Zell-Rezeptoren und MHC-Klasse II Antigenen in Zellen des Mikromilieus durch Zugabe von staphylogenen Superantigenen (SA) während der Kokultivierungsdauer hergestellt.

Um das „passende“ Superantigen für diese Experimente auszuwählen, wurden daher zunächst die TCR-V $\beta$  Elemente der TCC bestimmt.

#### 3.6.1 Phänotypisierung der V $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors

Um den V $\beta$ -Phänotypus des T-Zell-Rezeptors zu bestimmen, wurden die etablierten TCC nach Doppelfärbung mit einem CD3-Antikörper und jeweils einem Antikörper jeder TCR-V $\beta$ -Gruppe durchflußzytometrisch bestimmt. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für den TCC E9.



**Abbildung 4**  
TCR-V $\beta$ -Phänotypisierung eines TCC aus Blut

Isotypkontrolle (FITC markierter IgG1 Antikörper)

Bindung FITC-markierter anti-TCR-V $\beta$  5.1 Antikörper an den TCC E9

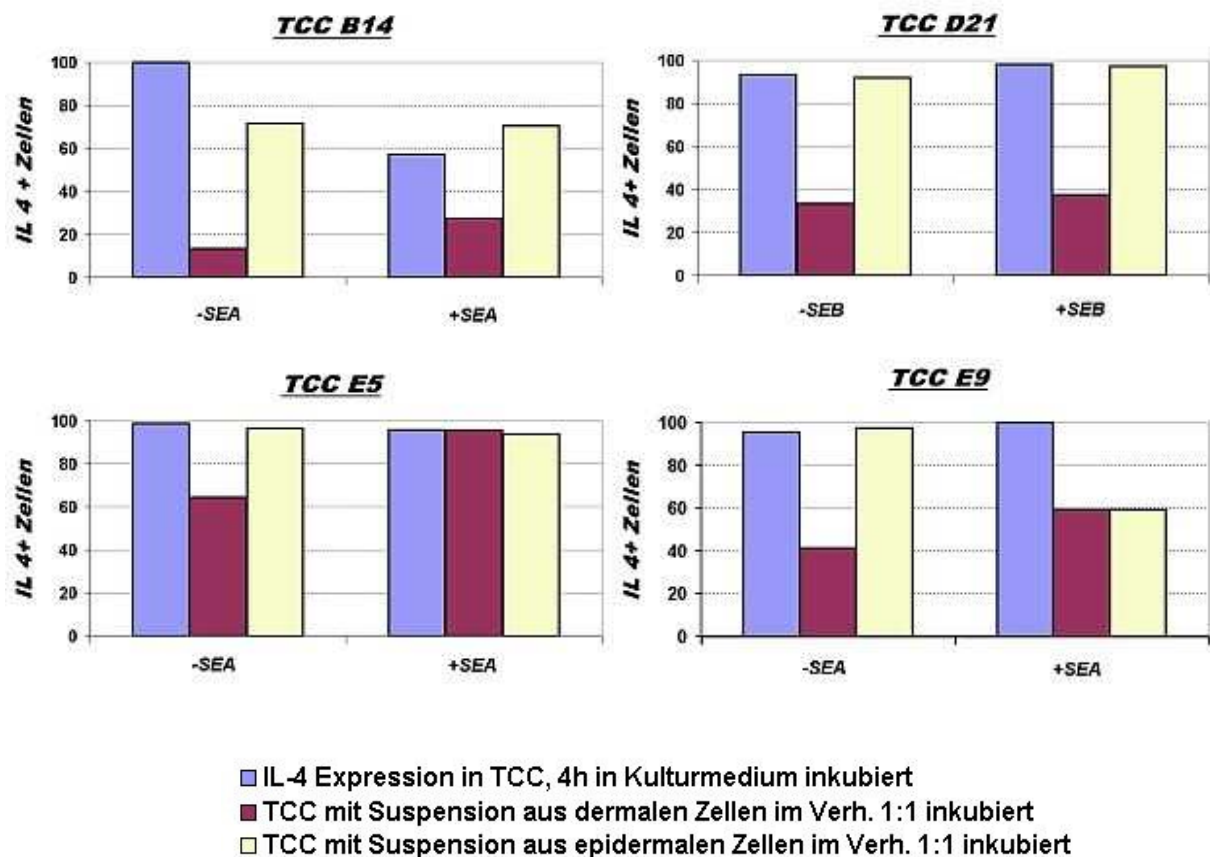
**Tabelle 9**  
**TCR-V $\beta$ -Typ von TCC aus verschiedenen Kompartimenten**  
Diese wurden in späteren Experimenten (siehe 3.6.2) verwendet

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quelle des TCC</b>	<b>TCR-V<math>\beta</math>-Element</b>	<b>Bindendes Superantigen</b>
E5	Epidermis	TCR-V $\beta$ 9	SEA
E9	Epidermis	TCR-V $\beta$ 5.1	SEA
D21	Dermis	TCR-V $\beta$ 14	SEB
B14	Blut	TCR-V $\beta$ 5.1	SEA

### 3.6.2 Expression von IL-4 in Nickel-spezifischen T-Zellklonen unter verschiedenen Kulturbedingungen

Nach Kokultur von TCC mit dermalen bzw. epidermalen Zellen wurden die Zellen gewaschen, über vier Stunden mit Phorbolestern (PMA), Ionomycin und Calcium-Ionophor in Anwesenheit von Brefeldin stimuliert, mit Saponin permeabilisiert und mit direkt markierten Zytokin-spezifischen Antikörpern und CD3-Antikörpern gefärbt.

Die IL-4 Expression der TCC aus den Kompartimenten Blut (B14), Dermis (D21) und Epidermis (E5 und E9) wurde in Kulturmedium und nach Zusatz von dermalen bzw. epidermalen Zellen im Verhältnis 1:1 in An- und Abwesenheit des „passenden“ Superantigens (SA) gemessen.



#### Abbildung 5

Durchflußzytometrische Messung der intrazellulären Expression von IL-4 in Nickel-spezifischen TCC, die in Medium oder mit dermalen oder epidermalen Zellsuspensionen kokultiviert wurden

Dargestellt ist der Anteil Zytokin- und CD3- positiver T-Zellen .

(Die Superantigene (SEA, SEB) wurden in Kulturen in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben).

Eine zweitägige Kokultur von TCC mit dermalen Zellsuspensionen führte zur deutlichen Reduktion der IL-4 exprimierenden TCC (Abbildung 5, Tabelle 10). Die Kokultivierung mit epidermalen Zellsuspensionen hatte dagegen kaum einen Effekt auf den Anteil IL4+ TCC. Durch eine gleichzeitige Inkubation mit Superantigen blieb der Trend dieser Beobachtung erhalten, wenngleich die Reduktion von IL4+ TCC in Anwesenheit von dermalen Zellsuspensionen geringer war (Tabelle 10).

**Tabelle 10**  
**Hemmung von IL-4 in Nickel-spezifischen TCC nach Kokultivierung mit dermalen Zellsuspensionen**

Kulturbedingungen der TCC	IL-4 positive TCC (in %)	IL-4 positive TCC (in %) (nach zusätzlicher Stimulation mit Superantigen)
Kulturmedium *	97	88
Kokultivierung mit <i>dermalen</i> Zellen	38	54
Kokultivierung mit <i>epidermalen</i> Zellen	89	80

\* Kulturmedium: ISCOVE-Basismedium + 4% humanes AB-Serum  
TCC wurden im Verhältnis 1:1 mit dermalen bzw. epidermalen Zellen inkubiert,  
die nach Isolation aus nicht-läsionaler Haut 16 h bis 24 h vorkultiviert waren

### 3.6.3 Expression von IFN- $\gamma$ in Nickel-spezifischen T-Zellklonen unter verschiedenen Kulturbedingungen

Der Einfluß von dermalen und epidermalen Zellsuspensionen wurde auch auf die IFN- $\gamma$  Produktion der vier TCC untersucht. In der Mediumkontrolle zeigte sich, daß die beiden TCC E9 und B14 eine sehr hohe IFN- $\gamma$  Expression aufwiesen, während der Anteil IFN- $\gamma$  + Zellen bei den TCC E5 und D21 deutlich geringer war. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt daher für TCC E9 und B14 bzw. E5 und D21 in Tabelle 11 und 12 getrennt.

**Tabelle 11**  
Einfluß von dermalen und epidermalen Zellen auf TCC mit einer hohen „spontanen“ IFN- $\gamma$  Expression

Kulturbedingung der TCC	IFN- $\gamma$ positive TCC ( in %) (TCC E9)	IFN- $\gamma$ positive TCC ( in %) (TCC B14)
Kulturmedium *	99	100
Kokultivierung mit <i>dermalen</i> Zellen	18	9
Kokultivierung mit <i>epidermalen</i> Zellen	42	35
Kulturmedium + Superantigen	91	100
Kokultivierung mit <i>dermalen</i> Zellen + Superantigen	41	13
Kokultivierung mit <i>epidermalen</i> Zellen + Superantigen	35	66

\* Kulturmedium (KM): ISCOVE-Basismedium + 4% humanes AB-Serum  
TCC wurden im Verhältnis 1:1 mit dermalen bzw. epidermalen Zellen inkubiert, die 16 h bis 24 h vorkultiviert waren. Das verwendete Superantigen (SEA) stimulierte die TCR-V $\beta$ 5.1+ TCC E9 bzw. B14.

Tabelle 12

**Anstieg von IFN- $\gamma$  positiven TCC durch Kokultivierung mit dermalen und epidermalen Zellsuspensionen und Superantigenen in Kulturen, in denen nur wenige Zellen spontan IFN- $\gamma$  exprimierten**

Kulturbedingungen der TCC	IFN - $\gamma$ positive TCC ( in %) (TCC E5)	IFN - $\gamma$ positive TCC ( in %) (TCC D21)
Kulturmedium *	21	13
Kokultivierung mit <i>dermalen</i> Zellen	38	35
Kokultivierung mit <i>epidermalen</i> Zellen	22	16
Kulturmedium + Superantigen	75	22
Kokultivierung mit <i>dermalen</i> Zellen + Superantigen	80	76
Kokultivierung mit <i>epidermalen</i> Zellen + Superantigen	60	35

\* Kulturmedium (KM): ISCOVE-Basismedium + 4% humanes AB-Serum

TCC wurden im Verhältnis 1:1 mit dermalen bzw. epidermalen Zellen inkubiert, die maximal 24h vorkultiviert waren. Die verwendeten Superantigene stimulierten die jeweiligen TCC:

SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) wurde für den TCR-V $\beta$  9+ TCC E5 verwendet,

SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) für den TCR-V $\beta$  14+ TCC D21.

Wie die Tabellen zeigen, kam es nach Kokultivierung mit dermalen Zellen in TCC, die in Kulturmedium weniger als 30% IFN- $\gamma$ + TCC aufwiesen, zum Anstieg dieses Zytokins, während epidermale Zellsuspensionen diesen Effekt auf TCC nicht hatten (Tabelle 12).

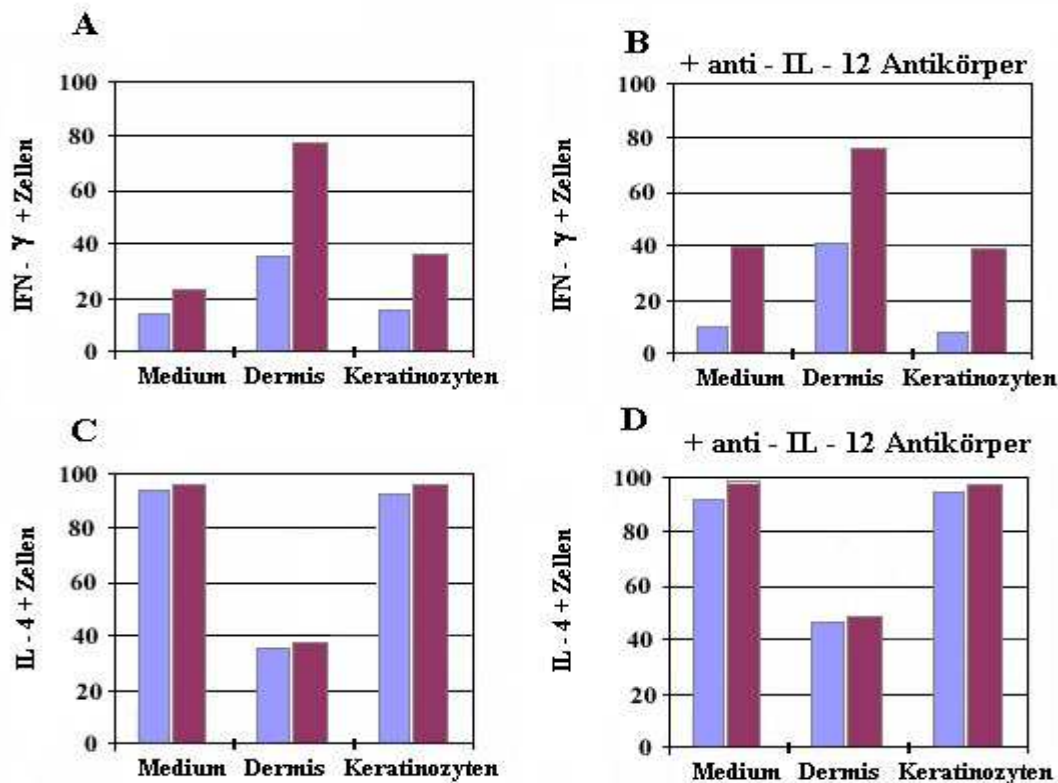
Durch Kokultivierung mit Superantigenen (SA) kam es unter vergleichbaren Bedingungen (d.h. in Anwesenheit von Kulturmedium oder dermalen bzw. epidermalen Zellsuspensionen) immer zum Anstieg von IFN- $\gamma$ .

Die beiden TCC E9 und B14 exprimierten bereits nach Kultur in Medium zu 99% bzw. 100% IFN- $\gamma$ . Überraschenderweise führte hier eine Kokultivierung sowohl mit dermalen als auch mit epidermalen Zellen zur deutlichen Reduktion von IFN- $\gamma$ + Zellen. Das gleiche Ergebnis ließ sich bei zusätzlich mit Superantigen stimulierten TCC erzielen (Tabelle 11). Somit führten sowohl dermale als auch epidermale Faktoren bei diesen TCC zunächst zur Reduktion von IFN- $\gamma$ , also zu einem Shift in Richtung eines Th2-Zytokinmusters.



### 3.6.4 Untersuchung des Einflusses von anti-IL-12 Antikörpern auf das Zytokinsekretionsmuster

Im folgenden wurde untersucht, ob anti-IL-12-Antikörper die zuvor gefundenen Effekte modulieren können. Dabei wurden Zellen des TCR-V $\beta$  14+ TCC D21 in An- oder Abwesenheit des „passenden“ Superantigens SEB mit dermalen oder epidermalen Suspensionen kokultiviert. In Parallelansätzen wurden den Kulturen blockierende anti-IL-12 Antikörper zugegeben.



blaue Balken (links): TCC ohne Superantigen in Medium  
rote Balken (rechts): TCC mit Superantigen in Medium nach 2-tägiger Zellkultur

#### Abbildung 6

#### IFN- $\gamma$ und IL-4 Expression eines TCC aus der Dermis (D21) eines nicht-atopischen Spenders mit allergischer Kontaktdermatitis mit und ohne Präinkubation mit anti-IL-12 Antikörpern

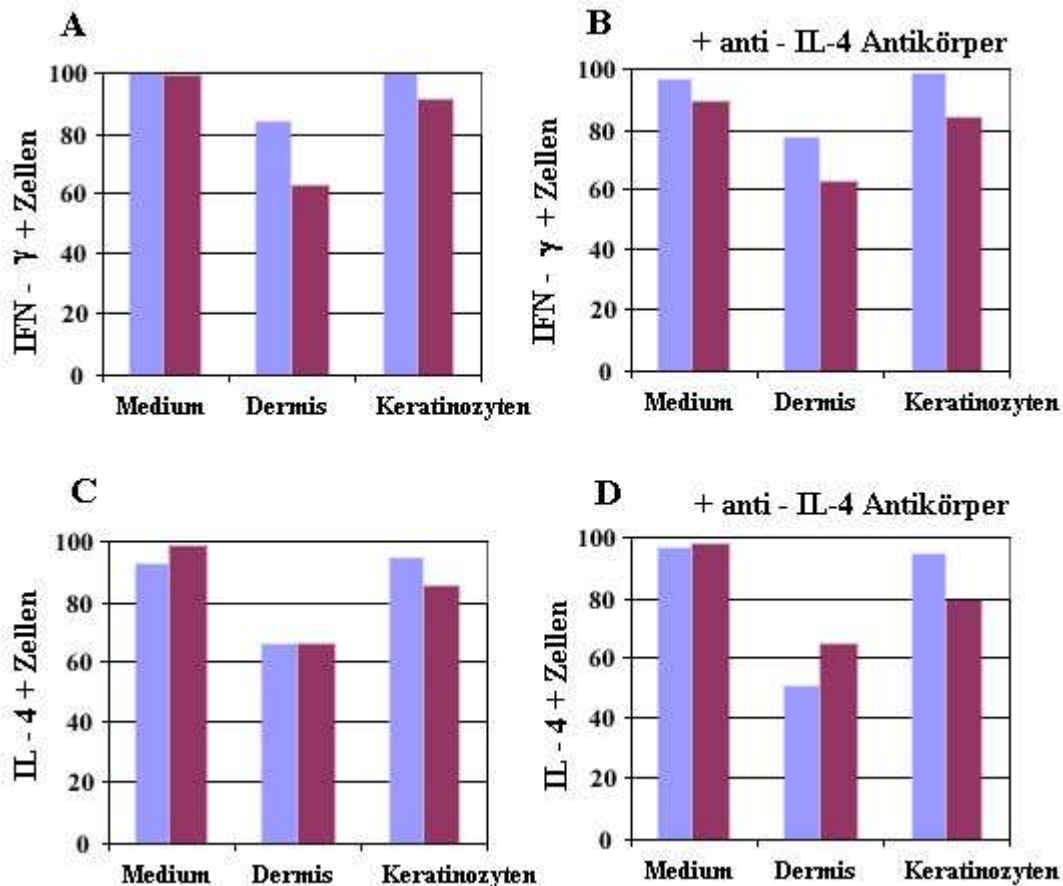
- A) IFN- $\gamma$  Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml)
- B) IFN- $\gamma$  Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml) nach Präinkubation des TCC mit anti-IL-12 Antikörpern (1 $\mu$ g/ml)
- C) IL-4 Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml)
- D) IL-4 Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml) nach Präinkubation des TCC mit anti-IL-12 Antikörpern (1 $\mu$ g/ml)

Weder der Anstieg von IFN- $\gamma$  in Anwesenheit von dermalen Zellsuspensionen und Superantigen, noch die Herabmodulation von IL-4 durch kutane Zellsuspensionen ließen sich durch die Kokultivierung mit blockierenden anti-IL12 Antikörpern inhibieren.

### 3.6.5 Untersuchung des Einflusses von anti-IL-4 Antikörpern auf das Zytokinsekretionsmuster

In einem getrennten Ansatz wurde untersucht, ob monoklonale IL-4-Antikörper die gefundenen Unterschiede im Zytokinmuster beeinflussen können.

Wieder wurde TCC D21 mit dem „passenden“ Superantigen SEB kokultiviert.



blaue Balken (links): TCC ohne Superantigen in Medium

rote Balken (rechts): TCC mit Superantigen in Medium nach 2-tägiger Zellkultur

#### Abbildung 7

#### IFN- $\gamma$ und IL-4 Expression eines TCC aus der Dermis (D21) eines nicht-atopischen Spenders mit allergischer Kontaktdermatitis mit und ohne Präinkubation mit anti-IL-4 Antikörpern

- A) IFN- $\gamma$  Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml)
- B) IFN- $\gamma$  Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml) nach Präinkubation des TCC mit anti-IL-4 Antikörpern (1 $\mu$ g/ml)
- C) IL-4 Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml)
- D) IL-4 Expression in An- oder Abwesenheit von Superantigen SEB (10 $\mu$ g/ml) nach Präinkubation des TCC mit anti-IL-4 Antikörpern (1 $\mu$ g/ml)

Auch der monoklonale anti-IL-4 Antikörper hatte keinen modulierenden Effekt auf die Differenzen im Zytokinmuster der TCC aus Kokultivierungsexperimenten.

### 3.6.6 Herabmodulation von IL-4 in Kontaktallergen-spezifischen Zellen durch dermale Zellen

Der in den Kokultivierungsexperimenten am deutlichsten zu beobachtende Befund bestand in der Heruntermodulation von IL-4 in TCC durch dermale Zellen. Dieser Einfluß von dermalen Zellen wurde nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen näher untersucht (Tabelle 13).

**Tabelle 13**

**IL-4 Expression nach 2 bzw. 6 Tagen Kokultivierung von Nickel-spezifischen TCC mit dermalen Zellen**

TCC	% IL-4+ T-Zellen in Medium	TCC + dermale Zellen
E5 (2 d)	98,90	64,43
E5 (6 d)	99,63	68,33
E9 (2 d)	95,64	41,57
E9 (6 d)	69,61	24,72
D21 (2 d)	92,75	65,96
D21 (6 d)	93,58	33,41

Es wurden aus dem Kompartiment Epidermis zwei TCC verwendet (E5 und E9), ein weiterer TCC stammte aus der Dermis (D21). Nach je 2 (2d) und 6 Tagen (6d) Inkubation mit dermalen Zellen wurde die IL-4 Expression durchflußzytometrisch bestimmt; nachdem zuvor eine Stimulation mit Phorbolestern und Calcium-Ionophor für 5 h durchgeführt worden war.

Wie in Tabelle 13 dargestellt, war die Herunterregulation von IL-4 durch dermale Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen zu beobachten. Zuvor wurde die Vitalität der T-Zellen mittels Trypanblau-Färbung kontrolliert. Sie lag in allen Fällen > 90%.

Insbesondere zeigte sich, daß das Zytokinmuster humaner TCC auch nach längerer, bis zu 6 Tage dauernder Inkubation noch modulierbar war.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einteilung der T-Helferzellen und ihre Zytokinexpression

Im Mausmodell werden T-Helferzellen, basierend auf dem Zytokinmuster, welches sie exprimieren, in 2 Unterklassen eingeteilt (*Mosmann 1986*): Hauptsächlich IFN- $\gamma$  und IL-2 freisetzende Zellen werden einem Th1-Subtyp zugeordnet, IL-4, IL-5 und IL-10 exprimierende Zellen einem Th2-Subtyp. Beiden Subtypen mit ihren unterschiedlichen Zytokinmustern werden verschiedene Funktionen zugeschrieben (*Mosmann 1987*): Th1-Zellen sind für die zelluläre Immunität „zuständig“, Th2 für die humorale, v.a. die IgE Synthese (*Maggi 1988*) und für die Differenzierung eosinophiler Granulozyten (*Wardlaw 1993*).

Eine Bestätigung für das 2-Phasen Modell fand man in vivo, indem man Mäusen Th2- bzw. Th1-Klone in die Pfoten injizierte, um eine lokale Entzündung zu verursachen. Das Ergebnis zeigte nach Verabreichung von Th2-Klonen eine schnelle, kurze Entzündungsantwort. Th1-Klone hatten hingegen eine spätere, länger anhaltende Entzündung zur Folge (*Müller 1993, Cher 1987*). Diese Art der Entzündungsantwort wird „delayed-type-hypersensitivity“ (DTH) Reaktion genannt, ist MHC-restringiert, hat ihren Höhepunkt nach 24 h (*Cher 1987*) und entspricht einer allergischen Reaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell.

Eine ähnliche Einteilung in ein Th1-Zytokinmuster, welches insbesondere durch die Expression von IFN- $\gamma$ , und ein Th2-Zytokinmuster, welches hauptsächlich durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 geprägt ist, existiert auch für menschliche T-Helferzellen, obwohl ihr Zytokinprofil nicht so stark polarisiert und heterogener ist. IL-2 und IL-10 können z.B. nicht den T-Helferzell Subtypen 1 oder 2 zugeordnet werden (*Umetsu 1988, Romagnani 1991, Del Prete 1993*).

Die Diskussionen der Untersuchungen zur Zytokinexpression bei der allergischen Kontaktdermatitis, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt sind, sollen sich dennoch weitgehend an dem Th1/Th2 Modell orientieren, wobei hier auf die „Schlüsselzytokine“ IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 fokussiert wird.

## 4.2 Einfluß des Kompartiments auf die Zytokinexpression von frisch isolierten Lymphozyten bei Nicht-Atopikern

Voruntersuchungen hatten zu dem zunächst überraschenden Befund geführt, daß Allergenspezifische T-Zellen nach Klonierung in vitro das Th2-Zytokin IL-4 produzieren, auch wenn die Zellen aus Epikutantest-Läsionen von Nicht-Atopikern generiert worden waren (Werfel 1997a und b).

Um auszuschließen, daß IL-4 in Nickel-spezifischen T-Zellen unter den Kulturbedingungen der T-Zellklonierung induziert wird, wurden hier frisch biopsierte Epikutantest-Läsionen auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz auf ihre IL-4- (und zum Vergleich auch IFN- $\gamma$ -) Expression untersucht.

In den hier dargestellten Versuchen konnte ohne zusätzliche In-vitro-Stimulation gezeigt werden, daß ein Teil der hautinfiltrierenden T-Lymphozyten IL-4 exprimiert, während in zirkulierenden Blutlymphozyten derselben Patienten kein IL-4 nachweisbar war. Nach Induktion von IL-4 und IFN- $\gamma$  durch Phorbol ester und Ionomycin über 5 Stunden war der Anteil IL-4 positiver Lymphozyten aus der Haut stets höher als der Anteil IL-4 positiver Blutlymphozyten.

Bei IFN- $\gamma$  positiven Lymphozyten verhielt es sich umgekehrt, hier war nach Stimulation der Anteil IFN- $\gamma$  positiver Zellen im Blut deutlich höher als in T-Zellen aus Epikutantest-Läsionen.

Die Mehrheit der T-Zellen aus Blut exprimierte dagegen signifikant mehr IFN- $\gamma$  als IL-4, entsprach also einem Th1 ähnlichen Zytokinmuster, wohingegen die Zytokinexpression von T-Zellen aus akuten Läsionen der Haut einem Th2/Th0 ähnlichen Zytokinmuster entsprach. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Färbung mit anti-IL-4 Antikörpern spezifisch war, da die Vorinkubation der Antikörper mit dem Liganden IL-4 eine Stunde vor Aufbringen auf die Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Bindung führte. In der vorliegenden Arbeit konnte somit das zuvor beschriebene Th1-Zytokinmuster von T-Zellen aus dem Blut bei allergischer Kontaktdermatitis (Kapsenberg 1992) bestätigt werden. In Epikutantest-Läsionen war dagegen ein Th2 ähnliches Zytokinmuster vorherrschend. Es ließ sich also die zuvor an TCC beschriebene IL-4 Produktion bei der allergischen Kontaktdermatitis mit einer anderen Methode reproduzieren.

### 4.3 Untersuchung des Zytokinmusters in frisch isolierten T-Zellen aus Epikutantest-Reaktionen gegen unterschiedliche Kontaktallergene

Um zu prüfen, ob eine IL-4 Produktion in akuten Ekzempläsionen ausschließlich bei der Nickel-Allergie oder auch bei anderen Kontaktallergenen zu beobachten ist, wurden Stanzbiopsien aus positiven Epikutantest-Läsionen verschiedener Kontaktallergien verwendet und in den daraus gewonnenen T-Zellen durchflußzytometrisch die Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  gemessen. Wiederum wurde das Zytokinmuster nicht-atopischer Spender mit allergischer Kontaktdermatitis untersucht, um einen möglichen Einfluß einer anlagebedingten IL-4 Überproduktion, wie sie bei atopischer Diathese diskutiert wird, auszuschließen.

Der Nachweis von IL-4 in Epikutantest-Reaktionen konnte mit dieser Methode nicht nur für Nickelsulfat, sondern auch für eine Reihe weiterer Kontaktallergene gezeigt werden. Anti-IL-4-Antikörper banden an eine Subpopulation von ca. 7% der permeabilisierten Hautinfiltrierenden Lymphozyten aus Epikutantest-Läsionen, welche zuvor nicht mit Phorbol ester, Calcium-Ionophor oder anderen Mitogenen stimuliert wurden. Diese Ergebnisse fanden sich bei Zellen aus Läsionen, die durch verschiedene Kontaktallergene (Quecksilber, Nickelsulfat, Chlormethylisothiazolin, Epoxidharz, Sesquiterpenlacton) provoziert wurden. Die Expression von IL-4 in Epikutantest-Reaktionen ist folglich nicht Nickel-spezifisch, sondern allgemein auf akute Ekzempläsionen bei der allergischen Kontaktdermatitis übertragbar.

### 4.4 Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone aus Epikutantest-Läsionen bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern

In der vorliegenden Arbeit sollten auch Nickel-spezifische Ekzemreaktionen unterschiedlicher Stadien (akute und chronische Ekzeme) genauer betrachtet und der mögliche Einfluß einer vorhandenen atopischen Diathese des Patienten auf das Zytokinmuster Kontaktallergenspezifischer TCC untersucht werden. Aus einer vorherigen Studie war bekannt, daß die Mehrheit Nickel-spezifischer (epi)-dermaler TCC aus Epikutantest-Läsionen (akutes Ekzem) von nicht-atopischen Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis IL-4 entweder in Verbindung mit IFN- $\gamma$  (Typ 0-Zytokinmuster) oder alleine (Typ 2-Zytokinmuster) produziert (*Werfel 1997b*). Das Th2-Zytokin IL-4 war unabhängig zuvor auch auf mRNA Ebene in Epikutantest-Läsionen gegen ein Kontaktallergen beschrieben worden (*Ohmen 1995*). Später wurde gezeigt, daß IL-4 mRNA nur in Epikutantest-Reaktionen (also in „akuten Ekzempläsionen“) auf Nickel, nicht jedoch in chronischen Spontanläsionen bei Nickel-sensibilisierten Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis nachweisbar war (*Wittmann 2001*).

Um die Unterschiede im Zytokinmuster Nickel-spezifischer T-Zellen zwischen nicht-atopischen und atopischen Individuen zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit die Expressionen von IL-4 und IFN- $\gamma$  in neu generierten TCC aus Epikutantest-Läsionen atopischer Patienten mit den bereits vorpublizierten Befunden nicht-atopischer Individuen verglichen.

Die mittlere IL-4 Sekretion von Nickel-spezifischen dermalen TCC aus Epikutantest-Läsionen war bei atopischen Patienten fast dreimal höher als bei nicht-atopischen Spendern. Im Gegensatz dazu war die IFN- $\gamma$  Sekretion in TCC aus Epikutantest-Läsionen atopischer Spender verglichen mit TCC nicht-atopischer Spender signifikant niedriger. Die Messungen ergaben also für atopische Spender, daß die meisten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen noch deutlicher als entsprechende TCC von Nicht-Atopikern in Richtung „Th2“ polarisiert sind.

Die Anwesenheit von Typ 2-Lymphozyten in Epikutantest-Läsionen als Modell des akuten Ekzems wurde früher als eine spezifische Eigenschaft von Inhalationsallergen-spezifischen T-Zellen betrachtet, die die Fehlregulation bei atopischer Dermatitis widerspiegelt (*Sager 1992*). Es wurde gezeigt, daß Atopiker nicht in der Lage sind, normal induzierte IFN- $\gamma$  Antworten zu generieren, was auf eine fehlregulierte exzessive IL-4- und IL-10-Produktion zurückgeführt wurde (*Lester 1995*). Die in der vorliegenden Studie gefundenen höheren IL-4 Sekretionen auch von Nickel-spezifischen TCC atopischer Spender im Vergleich zu Nicht-Atopikern stützen die Hypothese einer erhöhten Anlagebereitschaft zur IL-4 Produktion unter entsprechenden Milieubedingungen und zeigen darüber hinaus, daß diese nicht auf Inhalationsallergen-spezifische T-Zellen beschränkt ist.

Die Mehrheit der Nickel-spezifischen TCC aus Blut exprimierte dagegen ein Typ 1-Sekretionsmuster, es wurden aber auch Typ 0-Zellen aus Blut kloniert. Dieser Befund weist darauf hin, daß die Nickel-spezifische Immunantwort bezüglich der Zytokinsekretion heterogener ist, als zuvor angenommen (*Kapsenberg 1992, Romagnani 1996, Santamaria-Babi 1995*). Kapsenberg fand bei allen Nickel-spezifischen TCC Th1 ähnliche Antworten (*Kapsenberg 1992*). Diese Studie wird häufig als Beleg zitiert, daß die allergische Kontaktdermatitis beim Menschen eine Immunantwort von Typ 1-Zellen darstellt (*Romagnani 1996, Santamaria-Babi 1995*) und der DTH-Reaktion bei der Maus ähnelt (*Cher 1987*), was für einen zirkulierenden Pool und wahrscheinlich auch für die Situation in den lymphatischen Organen, nicht jedoch für das erkrankte Organ Haut zutrifft.



#### **4.5 Zytokinexpression Nickel-spezifischer T-Zellklone atopischer Individuen aus Blut und chronischen Hautläsionen bei allergischer Kontaktdermatitis**

In der vorliegenden Arbeit wurden Nickel-spezifische TCC nicht nur aus akuten Ekzempläsionen, sondern auch aus chronischen Läsionen generiert. Es sollte in diesen Versuchen die Frage beantwortet werden, ob sich der Switch im Zytokinmuster von Th2 zu Th1 bei der Chronifizierung von Ekzemen bei der atopischen Dermatitis auf die allergische Kontaktdermatitis übertragen läßt.

Tatsächlich konnte ein Überwiegen von IFN- $\gamma$  produzierenden TCC aus chronischen Hautläsionen der allergischen Kontaktdermatitis gezeigt werden, während TCC aus akuten Läsionen, wie oben diskutiert, zum großen Teil IL-4 produzieren. Dieses spricht für einen Switch im Zytokinmuster, der mit dem bei atopischer Dermatitis vergleichbar ist (*Grewe 1994, Ohmen 1995, Hamid 1994, Hamid 1996*). Die oben gestellte Frage kann soweit beantwortet werden, daß das Mikromilieu der Haut – unabhängig von einer atopischen Disposition – allergenspezifische T-Lymphozyten zur Produktion von Typ 2-Zytokinen in akuten und Typ 1-Zytokinen in chronischen Läsionen anregt.

#### **4.6 Einfluß des kutanen Mikromilieus auf die Zytokinexpression**

In weitergehenden Versuchen sollte der Einfluß dermalen und epidermalen Zellen auf das Zytokinmuster von T-Zellen bei der allergischen Kontaktdermatitis untersucht werden.

Dazu wurde das kutane Mikromilieu ex vivo in einem Modell untersucht, in dem Kokulturen mit T-Zellklonen von Patienten und dermalen bzw. epidermalen Zellfraktionen aus gesunder Haut angelegt wurden. Bei diesen Experimenten sind eine Vielzahl von Interaktionen zwischen konstitutionellen Hautzellen und T-Lymphozyten denkbar. So produzieren dendritische Zellen (dermale Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten) in bestimmten Aktivierungszuständen die Zytokine IL-12 und IL-18 (*Yawalkar 2000a*). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß IL-12 als Schlüsselzytokin eine IFN- $\gamma$  Produktion induzieren und eine IL-4 Produktion reduzieren kann (*Sugaya 1999*). Die Differenzierung humaner T-Zellen zu Th1-Zellen wird somit maßgeblich durch das Zytokin IL-12 induziert (*Chan 1991, Kubin 1994, Yawalkar 2000b*), chronische Läsionen der atopischen Dermatitis enthalten entsprechend erhöhte IL-12 mRNA Expressionen (*Hamid 1996*). Die IL-4 Synthese durch Th2-Zellen wird dagegen durch IL-12 inhibiert (*DeKruyff 1998*). IL-4 und IL-12 sind bei Maus und Mensch wichtige Determinanten bei der Generierung von Th1- und Th2-Zellen, sie können das Muster der Zytokinproduktion etablierter Th1- und Th2-Zellen verändern.



IL-12 bewirkt auch in Th2-Zellen, daß wieder IFN- $\gamma$  produziert werden kann (Seder 1997). Auch aktiviert IL-12 zytotoxische Lymphozyten (Yawalkar 2000a).

Th2-Zytokine, insbesondere IL-4, können auch von kutanen Mastzellen produziert werden. Bis heute ist unklar, wieweit die Interaktionen von Zellen der Haut mit infiltrierenden T-Zellen in der Summe eher zu einem Th2 oder zu einem Th1 Milieu führen können.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit üben dermale Zellfraktionen einen eindeutig hemmenden Einfluß auf die IL-4 Produktion von T-Lymphozyten aus, der auch nach einer räumlichen „Vernetzung“ von TCC und MHC II+ dermalen Zellen (also dermalen Makrophagen und dendritischen Zellen) durch Superantigene zu beobachten war.

Dagegen waren epidermale Zellen (in erster Linie Keratinozyten und epidermale dendritische Zellen) nicht in der Lage, die IL-4 Produktion von T-Zellklonen zu unterdrücken.

Komplizierter war das Bild bei der Produktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$ . Hier zeigte sich, daß Kontaktallergen-, d.h. Nickel-spezifische Klone, die wenig IFN- $\gamma$  produzierten, durch Ko-Inkubation mit dermalen Zellen - und weniger deutlich ausgeprägt auch mit epidermalen Zellen - zur IFN- $\gamma$  Produktion angeregt wurden.

Im Gegensatz hierzu kam es zu einer deutlichen Hemmung der Produktion des Th1-Zytokins durch dermale und epidermale Zellen in solchen T-Zellklonen, die bereits initial, d.h. während der Kultur in Medium sehr hohe IFN- $\gamma$  Expressionen beim intrazellulären Nachweis zeigten.

Durch „Vernetzung“ mit Superantigen blieb der Trend erhalten, wenngleich die Hemmung von IFN- $\gamma$  hier geringer war.

Das Zytokinmuster humaner TCC war auch nach längerer, bis zu 6 Tage dauernder Inkubation mit dermalen Zellen modulierbar. Zusammengefaßt weisen die Ergebnisse darauf hin, daß dermale Zellsuspensionen von gesunden Zellen eher in eine Th1 Richtung polarisieren können, während epidermale Zellen keine eindeutigen Effekte auf diese Zellen ausüben können.

Kritisch ist anzumerken, daß die Experimente aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit Allergenspezifischer TCC auf eine relativ geringe Anzahl begrenzt waren und die hier diskutierten Befunde mit anderen Methoden bestätigt werden sollten, bevor sie generalisiert werden können.

Aus den Ergebnissen kann aber dennoch geschlossen werden, daß das kutane Mikromilieu wichtige Effekte auf das Zytokinmuster von TCC ausübt, die den Shift von Th2 zu Th1 beim Übergang von akuten zu chronischen Ekzemen erklären können. Da weder anti-IL-12 noch IL-4 in der Lage waren, die Effekte von dermalen Zellen auf den Shift zu Th1 in TCC zu inhibieren, muß der Einfluß von anderen Zytokinen wie z.B. von IL-18 und von Typ 1 Interferonen diskutiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Zytokinmuster von T-Lymphozyten bei der allergischen Kontaktdermatitis wird kontrovers diskutiert. Erste Ergebnisse, welche vor der hier vorliegenden Arbeit erhoben wurden, sprachen für einen Wechsel von einem „Th1-Zytokinmuster“ in zirkulierenden Kontaktallergen-spezifischen Lymphozyten zu einem „Th0/Th2-Zytokinmuster“ in akuten Epikutantest-Läsionen bei der Nickel-Allergie. In dieser Arbeit wurde diese Beobachtung näher untersucht. Zum einen wurden die Zytokinmuster Nickel-spezifischer TCC von Atopikern mit denen von Nicht-Atopikern verglichen. Zum anderen wurde bei atopischen Spendern das Zytokinmuster von TCC aus Epikutantest-Läsionen als Modell für akute Läsionen mit dem von TCC aus chronischen Hautläsionen sowie mit dem von TCC aus Blut verglichen. Die Messungen ergaben für atopische Spender, daß die meisten Nickel-spezifischen TCC aus Epikutantest-Läsionen („akuten Ekzemen“) IL-4 in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  produzierten (also ein Typ 2 Muster aufwiesen) und diese IL-4 Produktion deutlich höher war als die IL-4 Produktion von Nicht-Atopikern, wohingegen die Mehrheit der TCC aus chronischen Läsionen oder aus Blut Typ 1 ähnliche Lymphozyten waren.

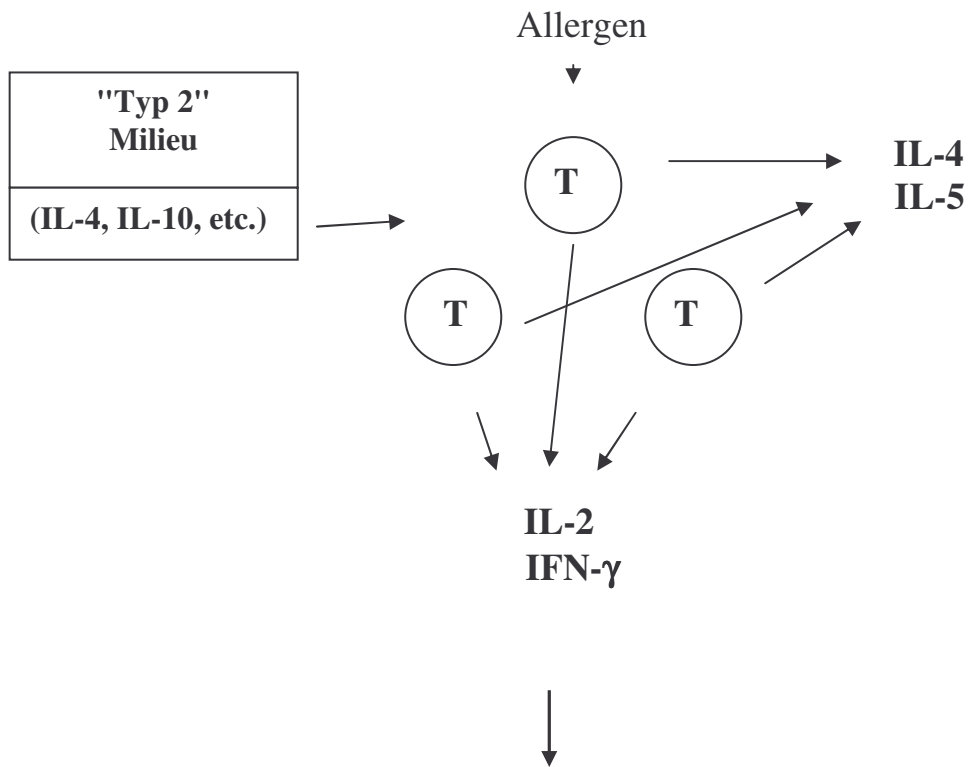
Die IFN- $\gamma$  Sekretion von TCC aus Epikutantest-Läsionen atopischer Individuen war - verglichen mit anderen TCC - sehr niedrig, wohingegen in Spontanläsionen und Blut jeweils höhere Expressionen gemessen werden konnten.

Um *in vitro* Einflüsse während der T-Zellklonierung auszuschließen, wurden mittels Durchflußzytometrie intrazelluläre Zytokine in frisch isolierten Lymphozyten aus Blut und Haut bei Patienten mit Kontaktallergien gegenüber verschiedenen Kontaktallergenen bestimmt. Ein Teil der hautinfiltrierenden T-Lymphozyten, die aus Epikutantest-Reaktionen isoliert und *in vitro* nicht weiter stimuliert worden waren, enthielt IL-4, während dieses Zytokin in zirkulierenden Blutlymphozyten nicht nachweisbar war. Auch nach Stimulation mit Phorbol ester und Calcium-Ionophor war der Anteil IL-4 positiver Lymphozyten aus der Haut deutlich höher als aus dem Blut. IFN- $\gamma$  positive Lymphozyten waren dagegen in Epikutantest-Reaktionen kaum nachweisbar.

Es zeigte sich darüber hinaus, daß das Zytokinmuster humaner TCC auch noch nach längerer *in vitro* Kultivierung modulierbar war. Die Kokultur von TCC mit dermalen Zellsuspensionen führte zu einer deutlichen Reduktion von IL-4 in Kontaktallergen-spezifischen TCC, während epidermale Zellsuspensionen kaum einen Effekt auf den Anteil IL-4 positiver TCC ausübten. Das Mikromilieu der Dermis führte bei TCC, die wenig IFN- $\gamma$  exprimierten, zu einem Anstieg dieses Zytokins. Weder anti-IL-12 noch IL-4 waren in der Lage, den „Th1-Shift“ durch dermale Zellen zu inhibieren, so daß der Einfluß von anderen Faktoren zu diskutieren ist (z.B. Typ1 IFN, IL-18).

Zusammengefaßt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie somit zusammen mit den diskutierten Ergebnissen anderer Untersuchungen auf eine IL-4 Produktion durch T-Zellen in akuten ekzematösen Läsionen bzw. Epikutantest-Läsionen hin, gleichgültig, ob es sich um eine atopische oder nicht-atopische Entzündung handelt. Der Nachweis von IFN- $\gamma$  sezernierenden, Nickel-spezifischen TCC aus chronischen Läsionen spricht für einen „Switch“ von Typ 2- zu Typ 0- oder Typ 1-Zytokinmustern bei der Chronifizierung von Ekzemen, wobei Milieufaktoren in der Dermis, in der die Mehrzahl der hautinfiltrierenden T-Zellen beim chronischen Ekzem zu finden ist, diese Polarisierung begünstigen können.

### AKUTES EKZEM



### CHRONISCHES EKZEM

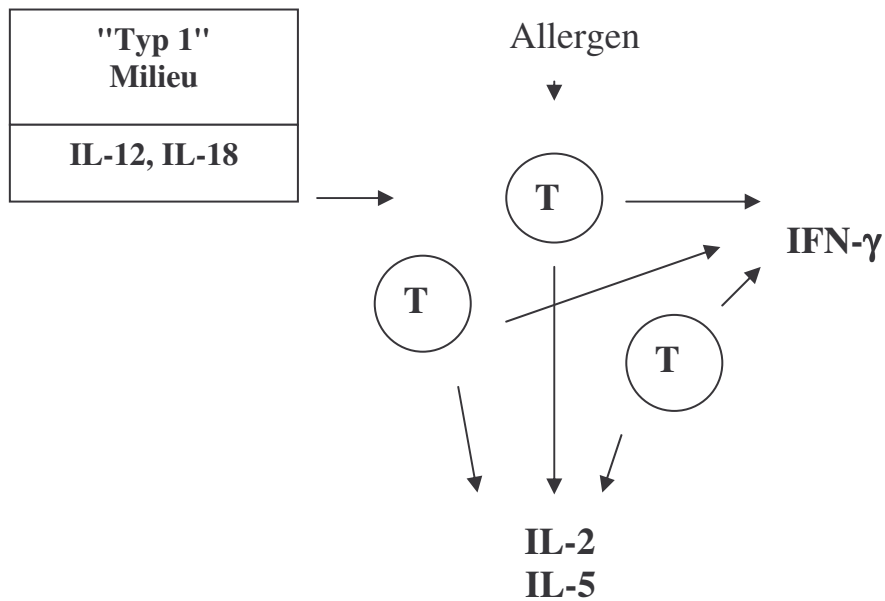


Abbildung 8  
Zytokinexpression beim akuten und chronischen Ekzem

## 6. Literatur

- (1) **Agrup, G.:**  
Sensitization induced by patch testing.  
Br. J. Dermatol. 1968, 80:631-634
- (2) **Al-Tawil, Marcusson, J.A., Möller, E.:**  
Lymphocyte transformation test in patients with nickel sensitivity:  
an aid to diagnosis.  
Acta Derm. Venereol (Stockholm) 1981, 61: 511-515
- (3) **Andersen, K.E., Burrows, D., White, I.R.:**  
Allergens from the standard series.  
In: Rycroft, R.J.G., Menné, T., Frosch, P.J. (Hrsg.): Textbook of contact dermatitis, 2.  
Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1995, 418-421
- (4) **Aspegren, N., Rorsmann, H.:**  
Short-term culture of leukocytes in hypersensitivity.  
Acta Dermatol. Venereol. (Stockholm) 1962, 42:412
- (5) **Barnetson, R.S.C., Gawkrödger, D.J.:**  
Eczema and contact dermatitis – Pathophysiology.  
In: Holgate, S.T., Church, M.K. (Eds.): Allergy. Gower Medical Publishing London 1993,  
S. 253
- (6) **Brasch, J., Henseler, T., Aberer, W., Bäuerle, G., Frosch, P.J., Fuchs,  
T., Fünfstück, V., Kaiser, G., Lischka G.G., Pilz, B., Sauer, C., Schaller,  
J., Scheurer, B., Szliska, C.:**  
Reproducibility of patch tests. A multicenter study of synchronous left- versus right-sided  
patch tests by the German Contact Dermatitis Research Group.  
J. Am. Acad. Dermatol. 1994, 31: 584-591
- (7) **Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H.:**  
Dermatologie und Venerologie 4. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1995, S.  
403-430
- (8) **Burton, J.L.:**  
Contact Dermatitis.  
In : Champion, R.H., Burton, J.L., Ebling F.J.G. (Eds.) : Textbook of Dermatology, 5th  
Edition Vol.1, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992, S. 537-540
- (9) **Caron, G.A., Sarkany, I., Williams, H.S., Todd, A.P.:**  
Radioactive method for the measurement of lymphocyte transformation in vitro.  
Lancet II 1965, 1266-1268
- (10) **Chan, S.H., Perussia, B., Gupta, J.W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H.A.,  
Wolf, S.F., Young, D., Clark, S.C., Trinchieri, G.:**  
Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor:  
characterization of the responder cells and synergy with other inducers.  
J. Exp. Med. 1991, 173: 869-879

- 
- (11) **Cher, D.J., Mosmann, T.R.:**  
Two types of murine helper T cell clone. II: Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones.  
J. Immunol. 1987, 138: 3688-3694
- (12) **Companjen, A.R., van der Velden, V.H., Vooy, A., Debets, R., Benner, R., Prens, E.P.:**  
Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form.  
Eur. Cytokine Netw. 2000, 11 : 383-390
- (13) **DeKruyff, R.H., Fang, Y., Umetsu, D.T.:**  
Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production.  
J. Immunol. 1998, 160: 2231-2237
- (14) **Del Prete, G.F., de Charli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Romagnani, S.:**  
Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.  
J. Immunol. 1993, 150: 353-360
- (15) **Del Prete, G.F., De Charli, M., Almerigogna, F., Daniel, C.K., D'Elis, M.M., Zanguoghi, G., Vinante, F., Pizzolo, G., Romagnani, S.:**  
Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing TH2-type cytokines.  
FASEB J., 1995, 9: 81-88
- (16) **Dellabona, P., Pecoud, J., Kappler J., Marrack, P., Benoist, C., Mathis, D.:**  
Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove.  
Cell 1990, 62: 1115-1121
- (17) **Dvorak, A.M., Mihm, M.C., Dvorak, H.F.:**  
Degranulation of basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis in man.  
J. Immunol. 1976, 116: 687-695
- (18) **Eisen, H.N., Orris, L., Belman, S.:**  
Elicitation of allergic skin reactions with haptens: the dependence of elicitation on hapten combination with protein.  
J. Exp. Med. 1952, 95: 473-485
- (19) **Everness, K.M., Gawkrödger, D.J., Botham, P.A., Hunter, J.A.A.:**  
The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an in vitro lymphocyte transformation test.  
Br. J. Dermatol. 1990, 122: 293-298
- (20) **Fleischer, B., Schrezenmeier, H.:**  
T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells.  
J. Exp. Med. 1988, 167: 1697-1707

- 
- (21) **Germain, R.N.:**  
MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation.  
*Cell* 1994, 76: 287-299
- (22) **Gimenez-Camarasa, J.M., Garcia-Calderon, P., Asensio, J., de Moragas, J.M.:**  
Lymphocyte transformation test in allergic contact nickel dermatitis.  
*Br. J. Dermatol.* 1975, 92: 9-15
- (23) **Glennon, J.D., Sarkar, B.:**  
Nickel (II) transport in human blood serum.  
*Biochem. J.* 1982, 203: 15-23
- (24) **Grewe, M., Gyufko, K., Schöpf, E., Krutmann, J.:**  
Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema.  
*Lancet* 1994, 343: 25-26
- (25) **Habu, Y., Seki, S., Takayama, E.:**  
The mechanism of a defective IFN-gamma response to bacterial toxins in an atopic dermatitis model, NC/Nga mice, and the therapeutic effect of IFN-gamma, IL-12, or IL-18 on dermatitis.  
*J. Immunol.* 2001, 166: 5439-5447
- (26) **Hamid, Q., Boguniewicz, M., Leung, D.Y.M.:**  
Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis.  
*J. Clin. Invest.* 1994, 94: 870-876
- (27) **Hamid, Q., Naseer, T., Minshall, E.M., Song, Y.L., Boguniewicz, M., Leung, D.Y.:**  
In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 98: 225-231
- (28) **Hartmann, M., Wittmann, M., Eilers, B., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Evidence for a switch in the cytokine pattern from type 2 to type 1 in acute versus chronic allergic contact dermatitis (ACD) in non-atopic patients.  
*Immunobiology* 1998, 199:546
- (29) **Hartmann, M., Eilers, B., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Zur Regulation von Interleukin-4 (IL-4) und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in allergenspezifischen T-Lymphozyten durch das kutane Milieu.  
*Allergologie* 1999, 9:584-585
- (30) **Hauser, C.:**  
Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity.  
*J. Invest. Dermatol.* 1990, 95: 436-44
- (31) **Herman, A., Croteau, G., Sekaly, R.-P., Kappler, J., Marrack, P.:**  
HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells.  
*J. Exp. Med.* 1990, 172: 709-717
- (32) **Herrmann, T., Accolla, R.S., Mac Donald, H.R.:**  
Different staphylococcal enterotoxins bind preferentially to distinct major histocompatibility complex class II isotypes.  
*Eur. J. Immunol.* 1989, 19: 2171-2174

- (33) **Huang, I.Y., Bergdoll, M.S.:**  
Primary structure of staphylococcal enterotoxin B.  
J. Biol. Chem. 1970, 245: 3493-3510
- (34) **Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga J.C., Stern L.J., Urban, R.G., Chi, Y.-I., Stauffacher, C., Strominger, J.L., Wiley, D.C:**  
Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen.  
Nature 1994, 368: 711-718
- (35) **Johnson, H.M., Russell, J.K., Pontzer, C.H.:**  
Superantigene als Krankheitsfaktoren  
Spek. Wiss. 1992, 6: 96-106
- (36) **Jung, E.G.:**  
Allergische Krankheiten  
aus: Dermatologie  
Hippokrates Verlag Stuttgart 1995, S.61- 65
- (37) **Kapp, A.:**  
Atopic dermatitis- the skin manifestation of atopy.  
Clin. Exp. Allergy 1995, 25: 210-219
- (38) **Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylstone, A., Carrel, S., Posnett D.N., Choi, Y., Marrack, P.:**  
V $\beta$ -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins.  
Science 1989, 244: 811-813
- (39) **Kapsenberg, M.L., Wierenga, E.A., Stiekema F.E., Tiggeleman A.M., Bos, J.D.:**  
Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+ T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals.  
J. Invest. Dermatol. 1992, 98: 59-63
- (40) **Keystone, E., Poplonski, L., Snow, K.M., Paige, C., Miller, R.G.:**  
Antigen-specific human T-cell colony formation in a liquid culture system.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1993, 53: 783-788
- (41) **Kotzin, B.L., Leung, D.Y.M., Kappler, J., Marrack, P.:**  
Superantigens and their potential role in human disease.  
Adv. Immunol.1993, 54: 99-166
- (42) **Kubin, M., Kamoun, M., Trinchieri, G.:**  
Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells.  
J. Exp. Med. 1994,180: 211-222
- (43) **Lefkovits, I., Waldmann, H. :**  
Limiting dilution analysis of the cells of immune system. I.: The clonal basis of immune response.  
Immunology Today 1984, 5: 261-268
- (44) **Le Gros, G., Ben-Sasson S.Z., Seder R., Finkelmann, F.D., Paul, W.E.:**  
Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vivo generation of IL-4 producing cells.  
J. Exp. Med. 1990, 172: 921-929



- (45) **Lester, M.R., Hofer, M., Gately, M., Trumble, A., Leung, D.Y.M.:**  
Down-regulating effects of IL-4 and IL-10 on the IFN- $\gamma$  response in atopic dermatitis.  
*J. Immunol.* 1995, 154: 6174-6181
- (46) **Mac Kie, R.M.:**  
Eczema and contact dermatitis – Diagnosis and treatment.  
In: Holgate, S.T., Church, M.K.: *Allergy*. Gower Medical Publishing London 1993, S. 263-275
- (47) **Maggi, E., Del Prete, G., Macchia, D., Parronchi, P., Tiri, A., Chrétien, I., Ricci, M., Romagnani, S.:**  
Profiles of cytokine activities and helper function for IgE in human T-cell clones.  
*Eur. J. Immunol.* 1988, 18: 1045-1050
- (48) **Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccini, M.P., Rugiu, F.S., de Carli, M., Ricci, M., Romagnani, S.:**  
Reciprocal regulatory effects of interferon-gamma and IL-4 on the in vitro development of human TH1 and TH2 clones.  
*J. Immunol.* 1992, 148: 2142-2147
- (49) **Maibach, H.I., Dannaker, C.J.:**  
Allergic contact dermatitis  
In: Middleton E. jr., Reed, C.E., Ellis, E.F., Adkinson jr., N.F., Yunginger, J.W., Busse, W.W.:  
*Allergy. Principles and Practice. Volume II.*  
Mosby, St. Louis 1993, 1605-1641
- (50) **McLeod, T.M., Hutchinson, F., Raffle, E.J.:**  
The uptake of labelled thymidine by leucocytes of nickel sensitive patients.  
*Br. J. Dermatol.* 1970, 82: 487-492
- (51) **Micusan, V.V., Thibodeau, J.:**  
Superantigens of microbial origin.  
*Semin. Immunol.* 1993, 5: 3-11
- (52) **Mosmann T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.:**  
Two types of murine helper T-cell clone. I.: Definition according to profiles of cytokine activities and secreted proteins.  
*J. Immunol.* 1986, 136: 2348-2357
- (53) **Mosmann, T.R., Coffman, R.L.:**  
Two types of mouse helper t-cell clone: Implications for immune regulation.  
*Immunology Today* 1987, 8: 223-227
- (54) **Müller, K.M., Jaunin, F., Masouye, I., Saurat, J.H., Hauser, C.:**  
Th2 cells mediate IL-4-dependent local tissue inflammation.  
*J. Immunol.* 1993, 150: 5576-5584
- (55) **Naseer, T., Hamid, Q.A., Minshall, E.M., Song, Y.L., Boguniewicz, M., Leung, D.Y.M.:**  
In vivo expression of interleukin-12 and interleukin-13 in atopic dermatitis.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 97: 423A
- (56) **Nethercott, J.R., Holness, D.L.:**  
Cutaneous nickel sensitivity in Toronto, Canada.  
*J. Am. Acad. Dermatol.* 1990, 22: 756-761

- (57) **Nielsen, N.H., Menné, T.:**  
Nickel sensitization and ear piercing in an unselected Danish population.  
Contact Dermatitis 1993, 29: 16-21
- (58) **Ohmen, J.D., Hanifin, J.M., Nickoloff, B.J., Rea, T.H., Wyzykowski, R., Kim, J., Jullien, D., McHugh, T., Nassif, A.S., Chan, S.C.:**  
Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions.  
J. Immunol. 1995, 154: 1956-1963
- (59) **Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chrétien, I., Abrams, J., de Vries, J., Spits, H.:**  
Simultaneous production of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones.  
J. Immunol. 1988, 141: 849-855
- (60) **Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.-P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A., Romagnani, S.:**  
Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88: 4538-4542
- (61) **Parronchi, P., de Charli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampognaro, S., Piccini, M.-P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., Romagnani, S.:**  
IL-4 and IFN ( $\alpha$  and  $\beta$ ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by TH1 or TH2 human T cell clones.  
J. Immunol. 1992, 149: 2977-2983
- (62) **Peltonen, L.:**  
Nickel sensitivity in the general population.  
Contact Dermatitis 1979, 5: 27-32
- (63) **Ramb-Lindhauer, C., Feldmann, A., Rotte, M., Neumann, C.:**  
Characterization of grass pollen reactive T-cell lines derived from lesional atopic skin.  
Arch. Dermatol. Res. 1991, 283: 71-76
- (64) **Räsänen, L., Tuomi, M.-L.:**  
Diagnostic value of the lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupational contact dermatitis.  
Contact dermatitis 1992, 27: 250-254
- (65) **Ricci, M.:**  
IL-4: a key cytokine in atopy.  
Clin. Exp. Allergy 1994, 24: 801-812
- (66) **Roitt, I.M., Brostoff, J., Male D.K.:**  
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1987, S. 253-271
- (67) **Romagnani, S.:**  
Human Th1 and Th2-subsets: doubt no more.  
Immunol. Today 1991, 12: 256-257
- (68) **Romagnani, S.:**  
Human TH1 and TH2 cells.  
Allergologie 1996, 19: 175-179

- (69) **Romagnoli, P., Labhardt, A.M., Sinigaglia, F.:**  
Selective interaction of Nickel with an MHC-bound peptide.  
EMBO Journal 1991, 10: 1303-1306
- (70) **Sager, N., Feldmann, A., Schilling, G., Kreitsch, P., Neumann, C.:**  
House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and cytokine profile in the allergen patch test  
J. Allergy Clin. Immunol. 1992, 89: 801-810
- (71) **Santamaria-Babi, L.F., Picker, L.J., Perez Soler, M.T., Drzimalla, K., Flohr, P., Blaser, K., Hauser, C.:**  
Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homin receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen.  
J. Exp. Med. 1995, 181: 1935-1940
- (72) **Schrezenmeier, H., Fleischer, B.:**  
Mitogenic activity of staphylococcal protein A is due to contaminating staphylococcal enterotoxins.  
J. Immunol. Methods 1987, 105: 133-137
- (73) **Schubert, H., Kohánka, V., Korossy, S., Nebenführer, L., Prater, E., Rothe, A., Szarmach, H., Temesvári, E., Ziegler, V.:**  
Epidemiology of nickel allergy: results of a follow-up analysis of patients with positive patch tests to nickel.  
Contact Dermatitis 1988, 18: 237-239
- (74) **Seder, R.A., Prussin, C.:**  
Are differentiated human T helper cells reversibel?  
Int. Arch. Allergy Immunol. 1997, 113: 163-166
- (75) **Silberberg, I., Baer, R.L., Rosenthal, S.A.:**  
The role of Langerhans cells in contact allergy.  
Acta Dermatol. Venerol. (Stockholm) 1974, 54: 321-331
- (76) **Sinigaglia, F., Scheidegger, D., Garotta, G., Scheper, R., Pletscher, M., Lanzavecchia, A.:**  
Isolation and characterization of nickel-specific T cell clones from patients with nickel-contact dermatitis.  
J. Immunol. 1985, 135: 3929-2932
- (77) **Sinigaglia, F.:**  
The molecular basis of metal recognition by T cells.  
J. Invest. Dermatol. 1994, 102: 398-401
- (78) **Strijbosch, L.W., Does, R.J.M.M., Buurman, W.A.:**  
Computer aided design and evaluation of limiting and serial dilution experiments.  
Int. J. Biomed. Comput. 1988, 23: 279-290
- (79) **Sugaya, M., Nakamura, K., Tamaki, K.:**  
Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon-gamma production by murine dendritic epiderma T cells.  
J. Invest. Dermatol. 1999, 113: 350-354

- (80) **Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., Tomura, M., Fujiwara, H., Tamaki, K.:**  
Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells.  
*J. Immunol.* 2000, 164: 5113-5119
- (81) **Taswell, C.:**  
Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies.  
*J. Immunol.* 1981, 126: 1614-1619
- (82) **Thepen, T., Langeveld-Widschut, E.G., Bihari, I.C., van Wichen, D.F., van Reijssen, F.C., Mudde, G.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M.:**  
Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 97: 828-838
- (83) **Thibodeau, J., Dohlsten, M., Cloutier, I., Lavoie, P.M., Bjork, P., Michel, F., Leveille, C., Mourad, W., Kalland, T., Sekaly, R.-P. :**  
Molecular characterization and role in T cell activation of staphylococcal enterotoxin A binding to the HLA-DR  $\alpha$ -chain.  
*J. Immunol.* 1997, 158: 3698-3704
- (84) **Umetsu, D.T., Jabara, H.H., de Kruyff, R.H., Abbas, A.K., Abrams, J.S., Geha, R.F.:**  
Functional heterogeneity among human inducer T cell clones.  
*J. Immunol.* 1988, 140: 4211-6
- (85) **Van der Heijden, F.L., Wierenga, E.A., Bos, J.D., Kapsenberg M.L.:**  
High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin.  
*J. Invest. Dermatol.* 1991, 97: 389-394
- (86) **Van Reijssen, F.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Kalthoff, F.S., Maggi, E., Romagnani, S., Westland, J.K.T., Mudde, G.C.:**  
Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of TH2 phenotype in patients with atopic dermatitis.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, 90: 184-192
- (87) **Wardlaw, A.J.:**  
Eosinophil adhesion receptors.  
*Behring Inst. Mitt.* 1993, 92: 178-183
- (88) **Werfel, T., Hartmann, M., Kapp, A.:**  
High IL-4 secretion from skin-derived nickel specific T - lymphocytes is associated with atopy and acute eczema in allergic contact dermatitis.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1998, 101s:129
- (89) **Werfel, T., Hentschel, M., Kapp, A., Renz, H.:**  
Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4 producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis.  
*J. Immunol.* 1997 (a), 158: 2500-2505
- (90) **Werfel, T., Hentschel, M., Renz, H., Kapp, A.:**  
Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997 (b), 113: 384-386

- 
- (91) **Werfel, T., Morita, A., Grewe, M., Renz, H., Wahn, U., Krutmann, J., Kapp, A.:**  
Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis.  
*J. Invest. Dermatol.* 1996, 107: 871-876
- (92) **Werfel, T., Kapp, A.:**  
Holgat Church 2000, 103-112
- (93) **White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W., Marrak, P.:**  
The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice.  
*Cell* 1989, 56: 27-35
- (94) **Wierenga, E.A., Snoek, M., de Groot, C., Chretien, I., Bos, J.D., Jansen, H.M., Kapsenberg, M.L.:**  
Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients.  
*J. Immunol.* 1990, 144: 4651-4656
- (95) **Wierenga, E.A., Snoek, M., Jansen, H.M., Bos, J.D., van Lier, R.A., Kapsenberg, M.L.:**  
Human atopen-specific types 1 and 2 helper cell clones.  
*J Immunol.* 1991, 147: 2942-2949
- (96) **Wittmann, M., Kowalczyk, J., Hartmann, M., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Eczematous skin lesions of allergic contact dermatitis and atopic dermatitis express a similar biphasic cytokine pattern.  
*J. Invest. Dermatol.* 1999, 113: 446
- (97) **Wittmann, M., Neumann, J., Kienlin, P., Eilers, B., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Evidence for a similar cytokine pattern expressed in allergic contact and atopic dermatitis.  
*Int. Arch. Allerg. Immunol.* 2001, 124: 346-348
- (98) **Yawalkar, N., Egli, F., Brand, C.U., Pichler, W.J., Braathen, L.R.:**  
Antigen-presenting cells and keratinocytes express interleukin-12 in allergic contact dermatitis.  
*Contact Dermatitis* 2000 (a), 42: 18-22
- (99) **Yawalkar, N., Karlen, S., Egli, F., Brand, C.U., Graber, H.U., Pichler, W.J., Braathen, L.R.:**  
Down-regulation of IL-12 by topical corticosteroids in chronic atopic dermatitis.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 (b), 106: 941-947
- (100) **Yssel, H., Shanafelt, M.-C., Soderberg, C., Schneider, P.V., Anzola, J., Peltz, G.:**  
Borellia Burgdorferi activates a T helper type 1-like T-cell subset in lyme arthritis.  
*J. Exp. Med.* 1991, 174: 593-601

## 7. Anhang

### 7.1 Wissenschaftliche Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde gefördert durch das Projekt Sonderforschungsbereich (SFB) 244 „Chronische Entzündung“, C13 der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG).

- (1) **Werfel, T., Hartmann, M., Kapp, A.:**  
High IL-4 secretion from skin-derived nickel specific T-lymphocytes is associated with atopy and acute eczema in allergic contact dermatitis.  
J. Allergy Clin. Immunol. 1998, 101s: 129
  
- (2) **Hartmann, M., Wittmann, M., Eilers, B., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Evidence for a switch in the cytokine pattern from type 2 to type 1 in acute versus chronic allergic contact dermatitis (ACD) in non-atopic patients.  
Immunobiology 1998, 199: 546
  
- (3) **Hartmann, M., Eilers, B., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Zur Regulation von Interleukin-4 (IL-4) und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in allergenspezifischen T-Lymphozyten durch das kutane Milieu.  
Allergologie 1999, 9: 584-585
  
- (4) **Wittmann, M., Kowalczyk, J., Hartmann, M., Kapp, A., Werfel, T.:**  
Eczematous skin lesions of allergic contact dermatitis and atopic dermatitis express a similar biphasic cytokine pattern.  
J. Invest. Dermatol. 1999, 113: 446

## 7.2 Lebenslauf

### Melanie Hartmann

Geburtstag:	10.05.74
Geburtsort:	Berlin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Jürgen und Theresa Hartmann, geb.: Schygulla
Familienstand:	ledig
Mai 1993:	Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn, Niedersachsen
Oktober 1993:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
August 1995:	Physikum an der Medizinischen Hochschule Hannover
März 1997:	1. Staatsexamen an der Medizinischen Hochschule Hannover  Promotion zum Thema: <i>Zytokinexpression bei allergischer Kontaktdermatitis</i> an der Hautklinik Linden der Medizinischen Hochschule Hannover
März 2000:	2. Staatsexamen an der Medizinischen Hochschule Hannover
April 2000 bis April 2001:	Praktisches Jahr an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 2001:	3. Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Sept. 2001 bis Feb. 2003:	Ärztin im Praktikum an der Hautklinik Linden der Medizinischen Hochschule Hannover
März 2003:	Beginn als Assistenzärztin in der Abteilung Dermatologie/ Phlebologie im Artemed Verbund im Krankenhaus Tabea in Hamburg

**Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung der  
Medizinischen Hochschule Hannover**

laut Nds. MBI. Nr. 37/ 1990, S.1276

Ich erkläre, daß ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte  
Dissertation mit dem Titel

**ZYTOKINEXPRESSION BEI ALLERGISCHER KONTAKTDERMATITIS**

in der Abteilung Dermatologie des Zentrums Dermatologie und Innere Medizin der Medizinischen  
Hochschule Hannover unter der Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. T. Werfel ohne  
sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort  
aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung  
zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.  
Teile der Dissertation wurden veröffentlicht (siehe Liste wissenschaftlicher Publikationen).

Hannover, den 12.08.2003



## **Danksagung**

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Alexander Kapp danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit in seinem Hause.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Werfel danke ich in besonderer Weise für die Überlassung des Themas, seiner kompetenten fachlichen Anregungen bei der Betreuung der Arbeit sowie Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit und die labortechnische Unterstützung danke ich Frau Dr. Konstanze Kirchhoff, Frau Birgit Eilers, Frau Petra Kienlin und Frau Gabriele Begemann.

Herrn Dr. med. Michael Schliz danke ich für wertvolle inhaltliche Diskussionen und produktive Zusammenarbeit, die der Fertigstellung dieser Arbeit außerordentlich dienlich waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater Herrn Jürgen Hartmann für seine Unterstützung in der Datenverarbeitung, Erstellung von Diagrammen und Tabellen und dem Layout. Meiner Mutter Frau Theresa Hartmann danke ich herzlich für das intensive Korrekturlesen.