

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Plewig

**Ex-vivo Untersuchungen zur Arzneimittelwirkung topischer Tacrolimus (FK-506)-  
Anwendung auf epidermale dendritische Zellen in läsionaler Haut bei Patienten mit  
atopischem Ekzem**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sheena Sharma

aus

New Delhi, Indien

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Wollenberg

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. N. Goebels  
Prof. Dr. J. Hasford

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2004

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1	DAS ATOPISCHE EKZEM .....	5
1.2	DIE DENDRITISCHEN ZELLEN DER HAUT .....	9
1.3	THERAPIE DES ATOPISCHEN EKZEMS .....	12
1.4	FK-506 / TACROLIMUS IN DER THERAPIE DES ATOPISCHEN EKZEMS .....	13
1.4.1	<i>Eigenschaften</i> .....	13
1.4.2	<i>Nebenwirkungen</i> .....	14
1.4.3	<i>Wirkungsmechanismus</i> .....	15
1.5	FRAGESTELLUNG .....	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>17</b>
2.1	PROBANDEN .....	17
2.2	DIE KLINISCHE STUDIE .....	17
2.3	BIOPSIEENTNAHME .....	18
2.4	VERARBEITUNG DER HAUTBIOPSIE UND HERSTELLUNG EINER EPIDERMALEN ZELLSUSPENSION .....	18
2.5	FÄRBUNG.....	19
2.6	FEHLERAUSSCHLUSS DURCH FÄRBUNG TOTER ZELLEN .....	20
2.7	EINMESSUNG ANHAND DER DURCHFLUßZYTOMETRIE .....	21
2.8	QUANTITATIVE ANALYSE .....	21
2.9	FUNKTIONELLE ANALYSE.....	22
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
3.1	KLINISCHE DATEN DER PATIENTEN UND BEHANDLUNGSERGEBNISSE .....	23
3.2	GESAMT-IGE .....	25
3.3	ZELLULÄRE ERGEBNISSE .....	26
3.3.1	<i>Verminderung der IDEC-Population der DC nach Tacrolimusbehandlung</i> .....	26
3.3.2	<i>Reduktion der FcR<math>\epsilon</math>1 Expression nach Tacrolimus</i> .....	29
3.3.3	<i>Normalisierung des gesamten entzündlichen Milieus in der Dermis nach Tacrolimusbehandlung</i> 31	
3.3.4	<i>Reduktion der Aktivierungsfähigkeit von epidermalen DC nach Behandlung mit Tacrolimus</i> .....	33
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>46</b>
6.1	ZUSAMMENSETZUNG DER MEDIEN UND LÖSUNGEN .....	46
6.2	DANKSAGUNG .....	48
6.3	LEBENS LAUF.....	49

## Verzeichnis der Abkürzungen

AE	atopisches Ekzem
DC	dendritische Zellen
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FcεRII / CD23	niedrigaffiner IgE-Rezeptor
IDEC	inflammatorische dendritische epidermale Zellen
LC	Langerhans Zellen
MFI	mean fluorescence intensity
rFI	relative fluorescence index
rSI	relative stimulation index
CPM	counts per minute
SMLR	skin mixed lymphocyte reaction

# 1 Einleitung

## **1.1 Das Atopische Ekzem**

Das atopische Ekzem (AE) stellt mit einer derzeitigen Inzidenz von ca. 4 % und steigender Tendenz eine der häufigsten Hauterkrankungen vor allem im Kindesalter dar. Eine steigende Prävalenz wird seit dem Zweiten Weltkrieg beobachtet und inzwischen sind ca. 10%-15% der Kinder weltweit von einem AE betroffen [29, 30].

Es handelt sich beim AE um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut mit vielfältigen Manifestationen. Das AE ist eine klinisch definierte Erkrankung. Bei dieser multifaktoriellen Erkrankung spielen eine Kombination aus Hautbeschaffenheit, genetischen, psychologischen, pharmakologischen und umweltbedingten Aspekten eine Rolle [30]. Aufgrund der diagnostischen Kriterien von Hanifin und Rajka besteht bei einem Patienten ein gesichertes AE, wenn je drei Haupt- und drei Nebenkriterien erfüllt sind (siehe Tab.1 ) [21].

Typische klinische Kennzeichen sind vor allem Xerosis, Pruritus, Lichenifizierung und verstärkte Anfälligkeit für kutane Infektionen. Während das Verteilungsmuster im Kindesalter gekennzeichnet ist durch einen eher generalisierten Befund mit Betonung der Hände, Ellenbogen, Kniebeugen und Nackenbereich mit zum Teil Eiterherden und Krusten, entsteht im höheren Alter ein lokalisiertes Muster der Beugen mit Lichenifizierung, Hyper- oder Depigmentierungen als Ausdruck einer postinflammatorischen Reaktion und deutliche Trockenheit der gesamten, somit der auch nicht betroffenen Haut [48]. Systemisch ist das AE mit einem erhöhten IgE-Spiegel assoziiert und zeigt lokale Infiltrationen von mononukleären Zellen, hauptsächlich T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen [12, 28]. Obwohl das AE häufig mit einem erhöhten gesamt IgE-Spiegel einhergeht, werden jedoch bei ca. 20 % der Patienten keine erhöhten IgE-Spiegel im Serum beobachtet. Daher wird eine Unterscheidung zwischen intrinsischem und extrinsischem AE in Abhängigkeit von einem signifikantem Anstieg des Gesamt- IgE diskutiert [43, 48].

**Tab.1** Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnose eines AE nach Hanifin und Rajka [21]: Zur Diagnosestellung müssen je 3 Haupt- und 3 Nebenkriterien zutreffen.

---

### Hauptkriterien

- Juckreiz
- Typische Morphologie und Verteilung: Lichenifikation in den Beugen (Erwachsene); Gesicht und Streckseiten (Kinder)
- Chronisch rezidivierende Dermatitis
- Eigen-oder Familienanamnese atopischer Erkrankungen

---

### Nebenkriterien

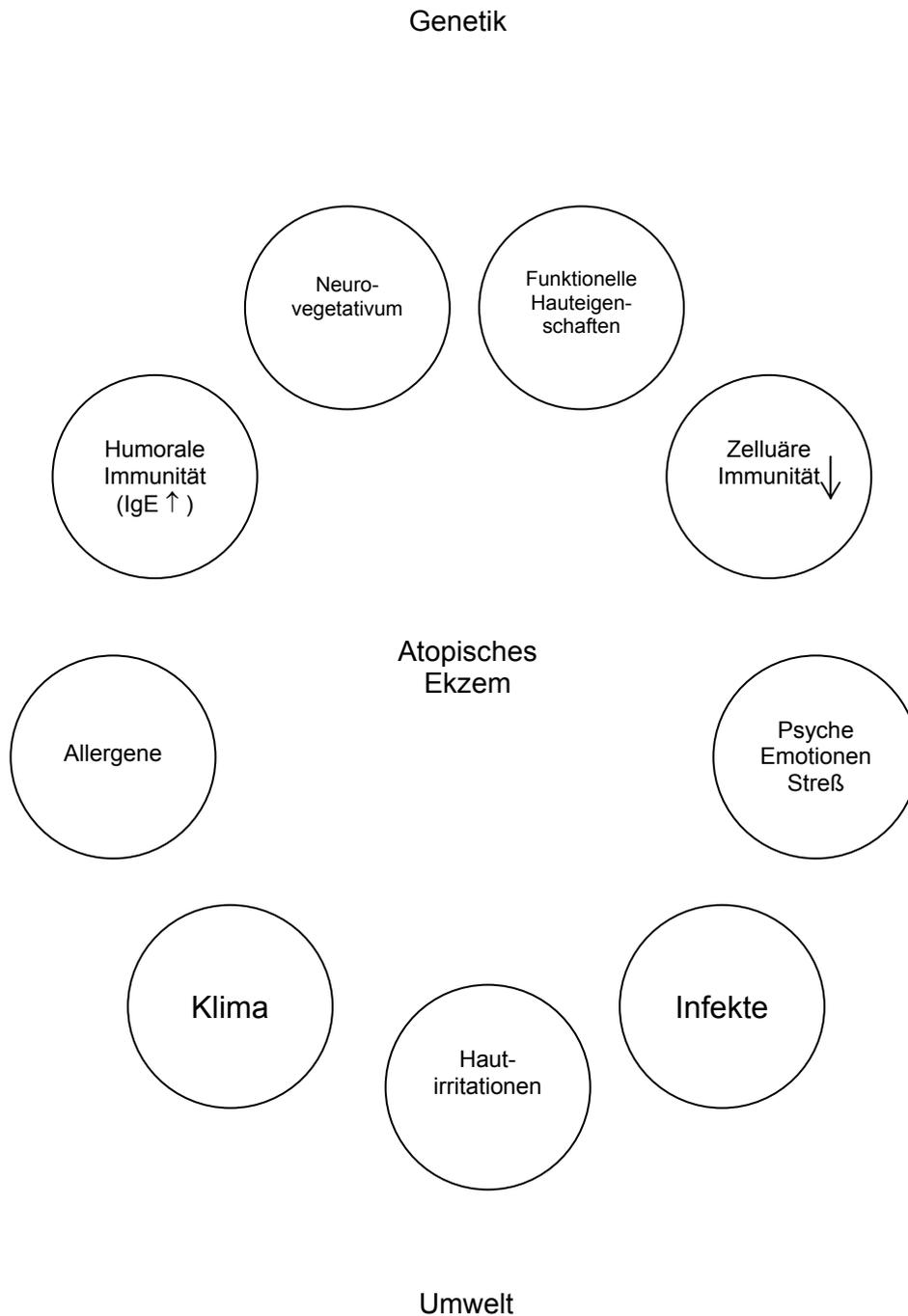
- Seborrhoe
  - Ichthyosis, I-Hand, Keratosis pilaris
  - Typ-I-Sensibilisierung
  - Erhöhtes Gesamt IgE
  - Früher Krankheitsbeginn
  - Neigung zu kutanen Infektionen
  - Neigung zu unspezifischem Hand- und Fußsekzem
  - Brustwarzenekzem
  - Chelitis
  - Rezidivierende Konjunktivitis
  - Dennie-Morgan-Falte
  - Keratokonus
  - Subkapsulärer Katarakt
  - Periokuläre Schatten
  - Gesichtsblässe oder Erythem an den Wangen
  - Pityriasis alba
  - Fältelung Nackenbereich
  - Jucken bei Schwitzen
  - Intoleranz von Wolle und Lösemitteln
  - Perifollikuläre Akzentuierung
  - Nahrungsmittelintoleranz
  - Abhängigkeit von Umwelt- und psychischen Faktoren
  - Weißer Dermographismus
-

Die Wahrscheinlichkeit an einem AE zu erkranken steigt, wenn mehrere Faktoren auftreten (siehe Abb.1). Die deutliche Trockenheit der gesamten Haut und die damit verbundene reduzierte Schutzfunktion ist mit einem Mangel an  $\gamma$ -Linolen Fettsäure assoziiert. Dies könnte die Ursache für die Verminderung von Glätte, Wasser und Lipidgehalt der Hautoberfläche sein [37, 46].

Eine kutane Sensibilisierung durch Aeroallergene und damit eine Triggerung des AE ist auch durch direktes Eindringen eines Allergens in die Haut bei gestörter Barrierefunktion oder durch inhalative allergische Reaktionen möglich. Außerdem hat sich beim AE eine erhöhte Besiedlung der Haut mit Staphylokokken gezeigt. Diese können Superantigene produzieren und fördern somit die bakterielle Superinfektion. Die von *Staph aureus* produzierten Superantigene erhalten das entzündliche Stadium des Ekzems vermutlich durch Stimulation der Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen aufrecht [8, 31].

Topische Glukokortikoide sind derzeit therapeutischer Standard der Interventionstherapie und zeigen bei korrekter und dermatologisch-kontrollierter Anwendung gute Erfolge. Sie werden jedoch häufig aus Angst vor Nebenwirkungen von Patienten abgelehnt. Bei schweren Formen kann auf die systemische Gabe von Glukokortikoiden oder auch Immunmodulatoren, wie Azathioprin, Methotrexat und Cyclosporin A zurückgegriffen werden. Wegen des schlechten Nutzen-Risiko-Verhältnisses sind diese Therapieformen jedoch nur für schwere Verlaufsformen gerechtfertigt. Tacrolimus zeigt im Vergleich zu den Glukokortikoiden in der topischen Behandlung von AE klinisch vielversprechende Erfolge mit geringer systemischer Aufnahme und fehlender Hautatrophie [1, 39, 40, 41]. Es ist jedoch wenig über den Einfluss von Tacrolimus auf das kutane Immunsystem und die Veränderung des entzündlichen Milieus auf zellulärer Ebene bekannt.

Multifaktorielle Genese des AE  
(modifiziert nach Braun-Falco, Plewig und Wolff)



**Abb.1** Verdeutlichung der multifaktoriellen Genese eines AE, durch Darstellung der angenommenen Auslöse- und Aggregationsfaktoren

## **1.2 Die dendritischen Zellen der Haut**

Dendritische Zellen (DC) bilden ein dichtes zelluläres Netzwerk innerhalb der Epidermis und auch an anderen Eintrittspforten, wie dem Epithel der Lunge, des Gastrointestinaltrakts und der Nasenschleimhaut [44]. Sie sind mit besonderen Eigenschaften ausgestattet, die sie zu einem wichtigen Bindeglied zwischen Umwelt und dem Immunsystem machen [3]. Im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, oder B-Zellen, sind die DC in der Lage eine primäre Immunantwort einzuleiten. Hierunter versteht man eine Immunantwort auf solche Antigene, die dem Immunsystem noch unbekannt sind. Frisch isolierte Langerhans Zellen (LC), die eine Subpopulation der DC darstellen, können antigenspezifische T-Zellen stimulieren. Es wird vermutet, dass die LC eine unreife Form der myeloiden DC darstellen. Sie gehen im Verlauf eine Wandlung ein, indem sie ihre Birbeck-Granula und Oberflächenantigene, wie CD1a oder CD4 verlieren und neue Adhäsionsmoleküle exprimieren. Produkte der Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I und Klasse II werden sehr stark heraufreguliert und der Phänotyp der LC ähnelt mehr dem der lymphoiden DC [3, 49].

Das AE ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die mit lokaler Infiltration von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen einhergeht. Den LC wird eine Schlüsselrolle bei der Genese dieser Hauterkrankung zugesprochen. LC entstammen dem Knochenmark und nehmen eine antigenprozessierende und antigenpräsentierende Funktion in der zellulären Immunantwort wahr. Sie sind also epidermal lokalisierte Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen [48]. Erstbeschreiber der LC war der Arzt und Pathologe Paul Wilhelm Heinrich Langerhans jr. (1847-1888). Ihre Aufgabe ist es, als Vorposten des Immunsystems zu fungieren.

Charakteristisch für LC, sind die zytoplasmatisch gelegenen, typischen Langerhans Zell Granula oder Birbeck Granula. Diese wurden erstmals 1961 von Michael S. Birbeck et al. beschrieben. Die Funktion dieser Granula ist derzeit noch unbekannt. Außerdem können LC über die Expression der Oberflächenmoleküle HLA-DR oder CD1a in der immunhistochemischen Färbung identifiziert werden [55]. Die LC bilden ein Netzwerk am gesamten Körper. Ihre Dichte ist mit  $450/\text{mm}^2$  am Körper und mit ca.  $60/\text{mm}^2$  an Hand- und Fußflächen bestimmt worden [2].

Neben den epidermalen LC wurde eine weitere Zellpopulation in entzündlich veränderter Haut nachgewiesen, die sogenannten inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). Die Besonderheit der IDEC ist die hohe Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ R1. Im

Gegensatz zu den Langerhanszellen exprimieren die IDEC den Oberflächenmarker CD11b und zeigen eine erhöhte Expression von CD1b und CD36.

Anhand des Zusammenspiels zwischen antigenpräsentierenden Zellen und antigenspezifischem IgE kann die antigenpräsentierende Kapazität um das etwa 100-fache gesteigert werden [33, 55]. Voraussetzung dafür sind IgE-tragende IgE-Rezeptoren an der Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zellen. Die relevanten IgE-Rezeptoren, die auf der Membran von humanen epidermalen LC identifiziert werden konnten, sind:

- ***der niedrig-affine IgE-Rezeptor CD23/FcR $\epsilon$ II :***

Dieser niedrig-affine IgE-Rezeptor CD23 wird auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, Thrombozyten und NK-Zellen exprimiert. Bieber et al. zeigten erstmals 1989, dass CD23 auf LC induzierbar ist [7]. Die Klonierung des Gens von FcR $\epsilon$ II/CD23 hat zwei Isotypen gezeigt, die sich nur durch sechs Aminosäuren unterscheiden. Es wird vermutet, dass sie unterschiedliche Aufgaben bei der Antigenpräsentation übernehmen und als Adhäsionsmolekül bei der Signalvermittlung zwischen T-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen fungieren. Die Epidermis läsionaler Haut beim AE zeigt eine vermehrte Expression dieses Rezeptors, wobei CD23 nicht membranständig exprimiert wird, sondern passiv an die Oberfläche der epidermalen DC angelagert ist [51].

- ***der hochaffine Rezeptor FcR $\epsilon$ I:***

Von besonderer Bedeutung ist der hochaffine IgE-Rezeptor FcR $\epsilon$ I [4]. Dieser Rezeptor spielt vermutlich eine signifikante Rolle bei Kontakt mit Aeroallergenen (Sofortreaktion, Typ I-Reaktion) und bei der T-zell vermittelten Spätreaktion (Typ-IV-Reaktion) [3]. Die Expression von FcR $\epsilon$ I wurde bereits auf Effektorzellen der Typ I-Reaktion, z.B. Mastzellen [35], basophilen und eosinophilen Zellen [18] und auf Vertretern der antigenpräsentierenden Zellen, wie LC [3, 47], IDEC [52], Monozyten [34] und zirkulierenden DC des peripheren Venenbluts [33] nachgewiesen. FcR $\epsilon$ I wird in unterschiedlicher Dichte auf LC exprimiert, wobei eine auffällig hohe Expression von FcR $\epsilon$ I in läsionaler Haut von Patienten mit AE gezeigt wurde [52]. In der nasalen Mukosa konnte ebenfalls FcR $\epsilon$ I nachgewiesen werden, so dass auch hier eine wichtige Rolle für die Induktion IgE vermittelter Reaktionen und Förderung der allergischen Entzündungsreaktion vermutet wird [20].

- **das IgE-bindende Protein Galectin3/εBP:**

Das IgE-bindende Protein εBP bindet IgE über dessen Zuckerseitenketten. Mit der durchflußzytometrischen Untersuchung konnte bestätigt werden, dass εBP intrazytoplasmatisch und als Oberflächenmolekül auf LC exprimiert ist. Keratinozyten weisen nur eine zytoplasmatische Form auf. εBP wird aufgrund seiner Struktur als löslich endogenes TypII Lektin klassifiziert [32, 50].

Eine Zusammenfassung der IgE-bindenden Rezeptoren mit Struktureigenschaften und Funktion zeigt Tab.2.

**Tab. 2** Eigenschaften der IgE-bindenden Strukturen auf DC

	<b>FcRεI</b>	<b>FcRεII</b>	<b>εBP</b>
<b>Struktur</b>	Tetramer/ Trimer	Monomer	Monomer
<b>Mr</b>	55 und 2 x 7.1 Kda	45 kDa	31 kDa
<b>Verteilung</b>	Mastzellen Basophilen DC	B-Zellen Monozyten Eosinophile Thrombozyten DC	Makrophagen Manche Epithelzellen
<b>Regulation</b>	IgE IL-3	IL-4, IFN-g IL-6, Prostaglandine	Entzündung
<b>Funktion</b>	Freisetzung von Mediatoren IgE-vermittelte Antigen-Präsentation	Antigen-Präsentation IgE-Regulation Hämatopoese Adhäsion?	Rezeptor Adhäsion Chemotaxis Zellwachstum Tumor Progression und Metastasierung

Außerdem besteht eine Korrelation der Expression von FcRεI mit dem IgE-Wert im Serum [52]. Interessant ist dabei, dass die LC auch bei Fehlen von Oberflächenrezeptoren, bereits einen intrazellulären Pool von α-Ketten des FcRεI besitzen. Die Oberflächenexpression von FcRεI wird über die γ-Ketten des FcRεI reguliert. Durch dieses Zusammenspiel kann in Abhängigkeit des entzündlichen Milieus eine Feinregulierung der FcRεI-Expression stattfinden [23].

### **1.3 Therapie des atopischen Ekzems**

Das Ziel der dermatologischen Behandlung ist die Beseitigung der kutanen Entzündung unter Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen der Therapeutika. In der Praxis fällt dem Patienten, der durch seine Erkrankung eine verminderte Lebensqualität erleidet, die Entscheidung bei der großen Vielfalt von Therapieangeboten schwer. Jeder Patient bedarf einer individuell angepassten Therapie, die sich je nach Schweregrad der Erkrankung aus lokalen und systemischen Therapieoptionen zusammenstellt. Die Behandlung erfordert konsequente und langjährige Therapie welches mit entsprechenden Behandlungskosten verbunden ist.

Systemische Einnahme von Kortikosteroiden, Cyclosporin A, Methotrexat, Azathioprin und die Phototherapie haben zwar Erfolge in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen gezeigt, sind jedoch aufgrund ihrer Nebenwirkungen und der deshalb notwendigen strengen Indikationsstellung im Allgemeinen auf Dauer keine Lösung. Während Kortikosteroide die Immunabwehr des bereits geschwächten Patienten weiter senken können, ist Cyclosporin A nephrotoxisch und führt zu Hypertension, Methotrexat ist hepatotoxisch und die Phototherapie kann das Risiko für Hautkrebs erhöhen. Um die systemischen Nebenwirkungen dieser Therapeutika zu vermindern werden daher topische Behandlungsformen bevorzugt. Die Externa sollen für den Patienten nicht nur effektiv sein, sondern auch eine einfache Applikation ermöglichen und ästhetisch angenehm sein [9]. Die meisten Externa bieten diese Charakteristika nicht auf. Behandlungen mit Teer und Anthralin werden aus kosmetischen Gründen und erhöhtem Krebsrisiko [9] nun mehr aus historischen Gründen erwähnt. Bei der Behandlung von milden Formen werden üblicherweise Glukokortikosteroidexterna angewandt [10]. Die topischen Glukokortikoide haben eine lange Entwicklung hinter sich und haben sich im Laufe der Zeit durch ein besseres Nutzen-Risiko Verhältnis ausgezeichnet [42]. Dennoch sind mögliche Nebenwirkungen dieser Externa wie Hautatrophie, Hirsutismus und systemische Absorption [9], Gründe für deren Unbeliebtheit beim Patienten. Es wird daher weiterhin nach einer Alternative geforscht, die auch bei langjähriger Behandlung ein geringes Nebenwirkungsrisiko zeigt und die Lebensqualität des Patienten deutlich verbessert.

## **1.4 FK-506 / Tacrolimus in der Therapie des atopischen Ekzems**

### **1.4.1 Eigenschaften**

Tacrolimus, auch als FK-506 bekannt, ist eine Substanz aus der Stoffklasse der Makrolid-Laktone und war Ergebnis einer gerichteten Suche nach weiteren immunmodulierenden Substanzen. Die Substanz wurde erstmals 1984 in Japan aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliert. Der Name ist aus den Wörtern *Tsukuba* *Makrolid* und *Immunosuppressant* entstanden. Zahlreiche Verbindungen sind dabei zusätzlich aus der Gruppe der immunmodulierenden Makrolide bekannt geworden:

- Rapamycin (Sirolimus) aus *Streptomyces hygroscopicus*
- Ascomycine aus *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*
- Dunaimycine aus *Streptomyces diastatochromogenes*,

FK-506 ist der erste topisch genutzter Vertreter dieser Stoffklasse.

Zu beachten ist, dass zwischen Cyclosporin A und Tacrolimus keine strukturelle Verwandtschaft besteht. Beide Substanzen weisen jedoch sehr ähnliche biologische und immunmodulierende Wirkungen auf. Tacrolimus ist im Vergleich zu Cyclosporin A ca. 10-100 mal potenter und wird in deutlich geringerer Konzentration angewandt [10, 24]. Das Molekulargewicht von Tacrolimus liegt mit 822Da unter dem von Cyclosporin A (1202Da) und zeigt eine gute Permeabilität der Haut [27]. Tacrolimus penetriert die entzündete Haut viel besser als normale Haut [9]. Dies ist besonders für den Erfolg einer topischen Therapie bei entzündlichen Erkrankungen wie AE wichtig.

Eine bekannte und ernste Nebenwirkung der Therapie mit Kortikosteroiden ist der Einfluss auf die Kollagensynthese und die damit verbundene Hautverdünnung bis hin zur pergamentpapierartigen Veränderung der Haut nach langzeitiger Therapie. Die Studiengruppe Reitamo aus Helsinki, Finnland hat anhand von Ultraschallmessungen die Hautdicke nach Behandlungen mit Placebo, Betamethason und Tacrolimus beurteilt. Dabei konnte keine nachweisbare Wirkung von Tacrolimus auf den Kollagenstoffwechsel der Haut gemessen werden [39].

### 1.4.2 Nebenwirkungen

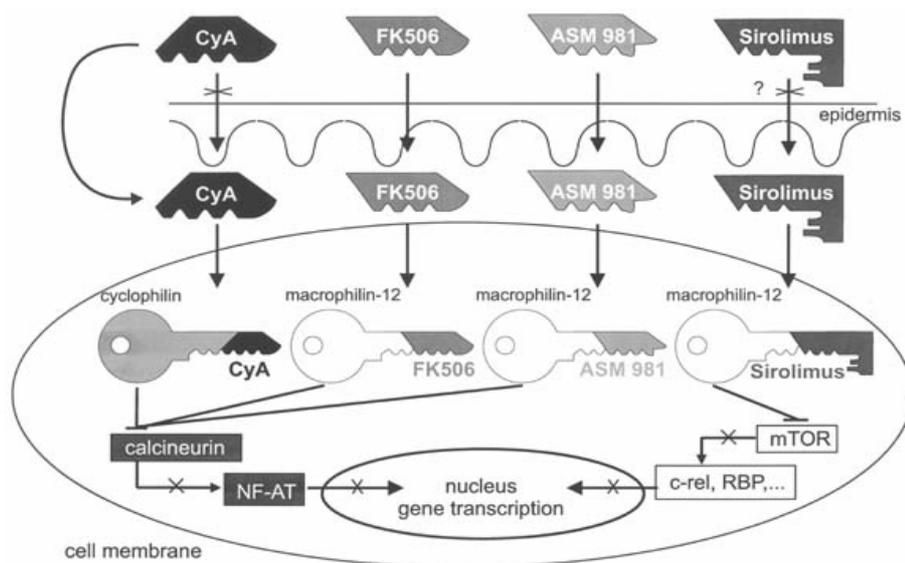
Während Cyclosporin A bereits für die Therapie entzündlicher Hauterkrankungen wie AE und Psoriasis zugelassen ist, konnte es sich nicht als Therapeutikum der ersten Wahl durchsetzen. Gründe dafür sind, dass die Wirkung nur bei systemischer Einnahme Erfolge zeigt, dabei aber entsprechende Nebenwirkungen zu berücksichtigenden sind. Die Nebenwirkungen reichen von Nephrotoxizität, Hypertonus und neurologischen Symptomen bis zu Hypertrichose und kutanen Malignomen. Die systemische Einnahme ist daher selten indiziert und unter ständiger Kontrolle durchzuführen. Tacrolimus hat bei systemischer Anwendung ebenfalls eine Reihe von Nebenwirkungen, die bei topischer Anwendung jedoch deutlich reduziert sind (siehe Tab.3). Eine Hypertrichose und Gingivahyperplasie wurde unter Tacrolimus bisher weder bei systemischer, noch topischer Gabe beobachtet. Zu beachten ist, dass Tacrolimus eine strukturelle Ähnlichkeit zu Makrolid-Antibiotika besitzt und daher bei Erythromycin-Unverträglichkeit kontraindiziert ist.

**Tab.3** Nebenwirkungen von Tacrolimus (FK-506) bei systemischer und topischer Anwendung (modifiziert nach E.C.Bornhövd) [10]

Systemisch	Topisch
Einschränkung der Nierenfunktion	Brennen beim Auftragen („Hitzegefühl“)
Hypertonie	Juckreiz
Elektrolytverschiebungen <ul style="list-style-type: none"><li>• Hyperglycämie</li><li>• Hyperkaliämie</li></ul>	Erythem
Neurologische Symptome <ul style="list-style-type: none"><li>• Kopfschmerzen</li><li>• Tremor</li><li>• Parästhesien</li><li>• Schlafstörungen, Müdigkeit</li></ul>	
Gastrointestinale Beschwerden <ul style="list-style-type: none"><li>• Übelkeit/Erbrechen</li><li>• Diarrhoe</li></ul>	
Hämatologische Symptome <ul style="list-style-type: none"><li>• Anämie</li><li>• Leukozytose/Leukozytopenie</li><li>• Thrombozytopenie</li></ul>	

### 1.4.3 Wirkungsmechanismus

FK-506 induziert seine Wirkung nach Bindung an FK-506-bindende Proteine (FKBP), die der übergeordneten Substanzklasse der Immunosuppressiva angehören. Der dadurch entstehende Komplex hemmt die Translokation von Calcineurin in den Zellkern und damit die Transkription verschiedener, vom ‚Nuclear factor of activated T-cells‘ (NF-AT) abhängiger Gene. Der entstandene Komplex aus Cyclosporin A und Cyclophilin beziehungsweise aus FK-506 und FKBP12 hemmt Calcineurin, indem es sich an Calcineurin bindet und deren Aktivität verhindert. Calcineurin ist zuständig für die Dephosphorylierung von NF-AT, welches wiederum die Gentranskription induziert [10] (siehe Abb.2).



**Abb. 2** Wirkmechanismus von Tacrolimus (FK-506), Cyclosporin A (CyA) und ASM 981 (neue Bezeichnung: Pimecrolimus) und Sirolimus im Überblick. *mTOR* : Angriffstelle für Rapamycin, *NF-AT*: nuclear factor of activated T-cells, *RBP*: Rapamycin-bindendes Protein [9]

## **1.5 Fragestellung**

Mit dieser Arbeit, soll die Arzneimittelwirkung topischer Tacrolimus (FK-506)-Therapie untersucht werden:

- a) Wie ist die klinische Effektivität anhand einer repräsentativen Gruppe von 10 Patienten mit AE zu diskutieren?
- b) Welche Veränderungen auf epidermale DC in läsionaler Haut, der mit topischem Tacrolimus behandelten Patienten können wir erkennen?
- c) Welche Bedeutung haben die beobachteten zellulären Veränderungen für unser Verständnis der immunologischen Vorgänge beim AE?

## 2 Material und Methodik

### **2.1 Probanden**

Es wurden Daten von 10 Patienten der dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erhoben, die im Rahmen einer multizentrisch klinischen Studie mit Tacrolimus behandelt wurden [41]. Alle Patienten hatten ein AE nach den Kriterien von *Hanifin und Rajka* [21] mit Abstufungen des Schweregrads von mäßig bis schwer entsprechend der Differenzierung nach *Rajka und Langeland* [38].

Der Schweregrad der zu behandelnden Haut wurde nach dem SCORAD-Index eingestuft [13], bei dem der Kliniker mehrere Kriterien, wie Erythem, Ödem, Nässen/Krustenbildung, Exkoration, Lichenifizierung und Trockenheit der nicht befallenen Haut beurteilt: -nicht vorhanden, -milder, -durchschnittlicher und -schwerer Befall. Der Patient hatte ebenfalls die Möglichkeit, sein subjektives Empfinden mit Angaben z.B. über Pruritus und Schlaflosigkeit, anhand einer visuellen Skala einzustufen.

### **2.2 Die klinische Studie**

Nach schriftlichem Einverständnis der Probanden wurde eine randomisierte Doppel-Blind-Studie durchgeführt, in der die Wirksamkeit einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Tacrolimus untersucht wurde [41]. Als Voraussetzung für eine Teilnahme an der Studie galt, dass die Probanden in den letzten 2 Wochen keine topische oder systemische Steroidbehandlung erhalten haben durften.

Zusätzlich mussten die Patienten eine Woche therapiefrei gewesen sein, d.h. es durfte nur mit Hautpflegemitteln behandelt werden, die keinen nachweisbaren Einfluss auf das AE zeigen. Die Patienten erhielten, entsprechend der Studienkriterien, entweder eine 0,03%ige, 0,1%ige, 0,3%ige Tacrolimusbehandlung oder die Salbengrundlage alleine ohne Wirkstoff als Placebo. Die Salbengrundlage bestand aus Propylencarbonat, weißem Wachs, mineralischen Öl, Vaseline und Paraffin. Die Behandlung erfolgte zweimal täglich für insgesamt drei Wochen auf einem umschriebenen, von AE betroffenen Areal mit ca. 200-1000 cm<sup>2</sup> Hautfläche. Im Regelfall wurden Gesicht und ein Arm behandelt, so dass ein Halbseitenversuch resultierte.

Bei acht Patienten wurde zu Beginn der Studie der Gesamt-IgE Spiegel mittels Elisa bestimmt (Enzygnost, Behringwerke, Marburg, FRG).

Für den klinischen Teil der Studie wurde der SCORAD-Index [13] an bestimmten Stichtagen erneut bestimmt, um den Behandlungserfolg zu beurteilen.

Die Stichtage waren wie folgt bestimmt worden:

Tag -7 (Therapiefreiheit bzw. Auswaschzeit)

Tag 0 (Beginn der Behandlung)

Tag 3,7,14,21 (Verlaufsvergleich)

Die gesamte Studie wurde nach den Richtlinien der „Declaration of Helsinki“ durchgeführt und wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

### **2.3 Biopsieentnahme**

Es wurden, nach schriftlichem Einverständnis der Probanden, ca. 1x1cm große tangentielle Biopsien, so genannte “shave-biopsies” entnommen. Dabei wurden bei den jeweiligen Probanden zwei Biopsien aus AE befallener Haut entnommen, einmal aus behandelter und einmal aus unbehandelter Haut. Die Hautproben wurden in Abhängigkeit zur Behandlungsdauer entnommen. Wir erhielten somit eine Hautprobe nach zwei Behandlungstagen, fünf Hautproben nach sieben Behandlungstagen, zwei Hautproben nach vierzehn Behandlungstagen und zwei Hautproben nach dreiwöchiger Behandlung. Die Hautentnahme erfolgte unter Lokalanästhesie mit Scandicain subcutan. Es erfolgte stets eine narbenfreie Wundheilung.

### **2.4 Verarbeitung der Hautbiopsie und Herstellung einer epidermalen Zellsuspension**

Die entnommenen Exzisionsbiopsien wurden, entsprechend den besonderen Ansprüchen für entzündliche Haut, sofort nach Entnahme in RPMI 1640/10% fetal calf serum (FCS) gelagert. Die Biopsie konnte somit bis zu 6 Stunden bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden. Zur weiteren Verarbeitung, wurde die Biopsie erst mit einer Phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) (siehe Rezept im Anhang), mehrmalig und vorsichtig gereinigt, um verbleibendes FCS gründlich zu entfernen.

In einer Petrischale wurde das Präparat in ca. 1.5 mm breite Steifen geschnitten und in 0,5%iger Trypsin-Lösung (siehe Anhang) eingebettet. So wurde das Präparat bei 37°C für ca.

90-120 Minuten aufbewahrt, bis es möglich war, die Epidermis von der Dermis mittels einer Pinzette vorsichtig zu trennen.

Nach Überführen der gelockerten Epidermis in ein Röhrchen mit 2 ml Waschmedium (Rezept im Anhang) und 200 µl 0,01%ige DNase Lösung (Rezept im Anhang) wurde das Röhrchen bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und für 1 Minute in einem Vortexgerät mäßig stark geschüttelt.

Die sich daraus ergebende Zellsuspension wurde durch ein 50 µm Nylonnetz in ein sauberes Röhrchen pipettiert und zusätzlich, zweimalig mit Facspuffer (PBS mit 1% FCS und 0,1% Natriumazid) nachgespült.

Schließlich wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer bestimmt und je 200,000 – 500,000 Zellen gleichmäßig auf alle Färberöhrchen verteilt.

## **2.5 Färbung**

Die Färbung wurde nach einem publizierten Protokoll durchgeführt [55]. Dabei erfolgten alle Inkubationen für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Primäantikörpern (siehe Tab.4) in einer Endkonzentration von 2µg/ml inkubiert.

Nach einmaligen Waschen wurde mit 5µl des Sekundäantikörpers GaM/ FITC einer Endverdünnung von 1:200 inkubiert. Freie Sekundäantikörper, die bei diesem Vorgang nicht gebunden wurden, wurden durch einen weiteren Waschvorgang entfernt. Die freien Bindungsstellen des Sekundäantikörpers wurden mit normalem Maus-Serum in einer Verdünnung von 1:30 blockiert und dann erneut gewaschen. Die Zellen wurden schließlich mit dem Phycoeythrin (PE) konjugierten T6RD1-Antikörper und 7-Amino-Acetinomycin –D (7AAD) mit einer Endverdünnung von 1:300 inkubiert.

**Tab. 4** Zusammenfassung der Primärantikörper und Seren mit Herkunft

Spezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
FcεRI	mAb 22E7	IgG1	Dr. J. Kochan, Hoffmann-La Roche Co., Nutley, NJ, USA
FcγRII/CD32	mAb IV.3	IgG2b	Medarex, W Lebanon, NH, USA
CD36	mAb IOP36	IgG2b	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD11b	mAb BEAR1	IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
‚Isotypkontrolle‘	MOPC	IgG1	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
‚Isotypkontrolle‘	UPC 10	IgG2b	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
murines IgG	Goat anti-mouse Antikörper (GaM/FITC)	IgG	Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA
-	Normales Maus Serum	IgG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Farbstoff (tote Zellen)	7-Amino-Acetinomycin-D (7AAD)	-	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CD1a	T6/RDI (PE)	IgG	Coulter, Krefeld, Deutschland

## 2.6 Fehlerausschluss durch Färbung toter Zellen

T6RD1 bindet an CD1a, welches stark auf den epidermalen LC exprimiert ist und in der normalen Epidermis für LC spezifisch ist [15, 52].

Auch tote Keratinozyten können vom T6RD1-Antikörper markiert werden und können dadurch zu gravierenden Verfälschungen der Ergebnisse führen. Um dies zu verhindern, war beim Auswerten eine genaue Abgrenzung zwischen abgestorbenen Keratinozyten und vitalen epidermalen Zellen mit 7-amino-actinomycin-D (7AAD) notwendig. 7AAD gelangt nicht in intakte Zellen und ist deshalb als langwellig emittierender Vitalfarbstoff geeignet. Dabei wurde 1 mg 7AAD in DMSO (Merck, Darmstadt, FRG) gelöst und als Stammlösung bei minus-20°C in Eppendorfröhrchen gelagert. Um vor Anwendung eine Arbeitslösung zu erhalten, wurde die Stammlösung in PBS mit 0,1%Na-Azid-Lsg. auf 50µg/ml Arbeitslösung verdünnt [55]. So kann die Arbeitslösung für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Um schließlich Fehler durch Färbung toter Zellen auszuschließen, werden 2µl Arbeitslösung während der letzten Antikörper Inkubation hinzugefügt.

## **2.7 Einmessung anhand der Durchflußzytometrie**

Über die Bindung an fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper können LC und IDEC durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität und Streulicht mit Hilfe der Durchflußzytometrie abgegrenzt werden [55]. Die hergestellten Zellsuspensionen wurden an einem FACScan-Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson eingemessen und die Daten mit Lysis II-Software ausgewertet. Die Durchflußzytometrie erlaubt die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen, wobei Zellgröße, Granularität und verschiedene Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden können. Die Differenzierung der Zellen erfolgt schließlich anhand der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse.

Durch eine Kombination von Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) und CD1aPE/7AAD (F12/F13) Parametern wurde die vitale CD1a positive dendritische Zellpopulation von den toten Zellen elektronisch eingegrenzt. Unsere Messröhrchen enthielten ungefähr  $2 \times 10^5$  Zellen.

## **2.8 Quantitative Analyse**

Für die quantitative Analyse wurden die IDEC und LC Populationen der CD1a positiven Zellfraktion manuell eingegrenzt. Die Intensität der entsprechenden Fluoreszenz (engl. mean fluorescence intensity, MFI) für jede Population wurde anhand der Cell Quest software (Becton Dickinson) bestimmt [55]. Der relative Fluoreszenz-Index (rFI) für alle Oberflächenrezeptor wurde mit nachfolgender Formel bestimmt:

$$\text{rFI} = ( \text{MFI (Rezeptor)} - \text{MFI (Kontrolle)} ) / \text{MFI (Kontrolle)}$$

## 2.9 Funktionelle Analyse

Um die Stimulationsfähigkeit von epidermalen DC auf autologe T-Lymphozyten in Abhängigkeit von einer Tacrolimustherapie zu messen, wurde die gemischte Haut-Lymphozyten-Reaktion (SMLR, skin mixed lymphocyte reaction) als Methode angewandt. Bei vier Patienten reichte die Zellmenge aus, um zusätzlich zur durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung eine funktionelle Untersuchung durchzuführen. Nach zweimaligem Waschen der Suspensionen mit Waschmedium wurde der Prozentsatz der CD1a-positiven Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zellsuspensionen aus behandelter und unbehandelter Haut wurden simultan hergestellt und bearbeitet, um Fehlerquellen zwischen beiden Suspensionen möglichst auszuschließen. Die autologen T-Zellen wurden aus heparinisiertem Venenblut der Patienten isoliert. Durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Lymphoprep-Gradienten und Aufreinigung über einer mit Nylonwolle gefüllten Trennsäule konnten die T-Zellen isoliert werden. Nach zweimaligem Waschen mit Waschmedium wurden schließlich  $1 \times 10^5$  T-Zellen jeweils mit einer epidermalen Zellsuspension, die  $2 \times 10^3$  CD1a positive Zellen enthielt, für 5 Tage in einer 96-Well Rundbodenplatte mit Gesamtvolumen von  $200 \mu\text{l}$  in Kultur genommen. Zusätzlich wurden zur Kontrolle, um spontane Zellaktivierung auszuschließen, jeweils  $1 \times 10^5$  T-Zellen ohne Zusatz von epidermaler Zellsuspension in Kultur genommen. Achtzehn Stunden vor Kulturabbruch wurde dem Kulturansatz  $^3\text{H}$ -Thymidin (in einer Aktivität von  $1 \mu\text{Ci/Well}$ ; Amersham International, Amersham, Großbritannien) hinzugefügt. Anschließend wurden die Kulturplatten auf  $-80^\circ\text{C}$  schockgefroren. Die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 2ml Szintillationsflüssigkeit in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (MINAXI Tri-CARB 4000, Packard, Downers Grove, USA) ermittelt. Die durchschnittlichen Zerfälle pro Minute (CPM, counts per minute) wurden gemessen und aus der gemischten Haut-Lymphozyten-Reaktion und der Kontrolle mit T-Zellen ein Stimulationsindex (rSI) ermittelt, um eine Vergleichbarkeit darstellen zu können:

$$\text{rSI} = \{ \text{CPM (SMLR)} - \text{CPM ( T-Zellen)} \} / \text{CPM ( T- Zellen)}$$

### 3 Ergebnisse

#### **3.1 *Klinische Daten der Patienten und Behandlungsergebnisse***

Wir behandelten insgesamt 10 Patienten im Rahmen der doppelblinden Studie mit 0,03%, 0,1%, 0,3%iger Tacrolimussalbe oder mit wirkstofffreier Salbengrundlage, also mit Placebo.

Wir hatten somit drei Patienten mit Placebo behandelt, vier Patienten mit 0,03%igem, einen Patienten mit 0,1%igem und zwei Patienten mit 0,3%igem Tacrolimus.

Zur weiteren Analyse wurden die behandelten Patienten abhängig vom Behandlungserfolg zum Biopsiezeitpunkt in 3 Gruppen und in die mit Placebo behandelte Kontrollgruppe zugeordnet:

**Placebo:** Gruppe der Patienten, die mit Placebo behandelt wurden und somit als Kontrollgruppe angesehen werden

**Responder:** Gruppe der Patienten, die nach Behandlung mit Tacrolimus eine klinische Verbesserung zum Zeitpunkt der Biopsie nachweisen

**Rebound:** Gruppe der Patienten, die initial eine klinische Verbesserung nachweisen, aber zum Zeitpunkt der Biopsie eine Exerzabation des Hautbefundes erkennen lassen

**Other:** Patienten, die in keiner der oben genannten Gruppe eingeteilt werden können

Insgesamt ergab sich folgende Verteilung mit Schweregrad der Erkrankung nach Rajka und Langeland [38] (siehe Tab.5).

**Tab.5** Verteilung der Tacrolimuskonzentration (0,03%, 0,1%, 0,3%) und Placebo mit Schweregrad des Hautbefunds und vorausgegangener Behandlungsdauer vor der Hautprobenentnahme

<b>Behandlung mit:</b>	<b>Patient (Nr.)</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Schweregrad des Hautbefunds</b>	<b>Behandlungsdauer vor Hautprobenentnahme (Tage)</b>
<b>Placebo</b>	110	17	7	7
	113	19	8	21
	119	30	8	21
<b>0,03% FK-506</b>	107	34	7	7
	109	28	5	7
	116	30	8	7
	118	20	8	14
<b>0,1% FK-506</b>	101	22	6	14
<b>0,3% FK-506</b>	108	31	7	2
	114	18	7	7

Somit kamen vier ‚responder‘ Patienten, zwei Patienten mit leichter Verbesserung unter Placebo und zwei Patienten mit ‚rebound‘ Phänomen zur Analyse. Zwei Patienten, die nicht eingeteilt werden konnten, kamen in die Gruppe ‚other‘: ein Patient wurde zum Zeitpunkt der Biopsie nur sehr kurz mit Tacrolimus behandelt (2 Tage), der zweite Patient zeigte auch unter Placebo eine spontane Befundbesserung (siehe Tab.6).

In der Gruppe der responder erkennt man anhand des Scorevergleichs vor Behandlung und zum Zeitpunkt der Biopsie, dass alle vier Patienten unter Tacrolimusbehandlung eine deutliche klinische Verbesserung des Hautbefundes zeigen. Das Präparat mit 0,03%igem FK-506 zeigt bereits einen klinischen Erfolg und die nächst höhere Dosierung mit 0,1% FK-506 zeigt sogar eine komplette Remission nach der Behandlung. Im Vergleich zeigen die zwei Patienten, die mit Placebo behandelt wurden, zwar eine Verbesserung ihres Hautbefundes, aber vergleichsweise nur sehr gering.

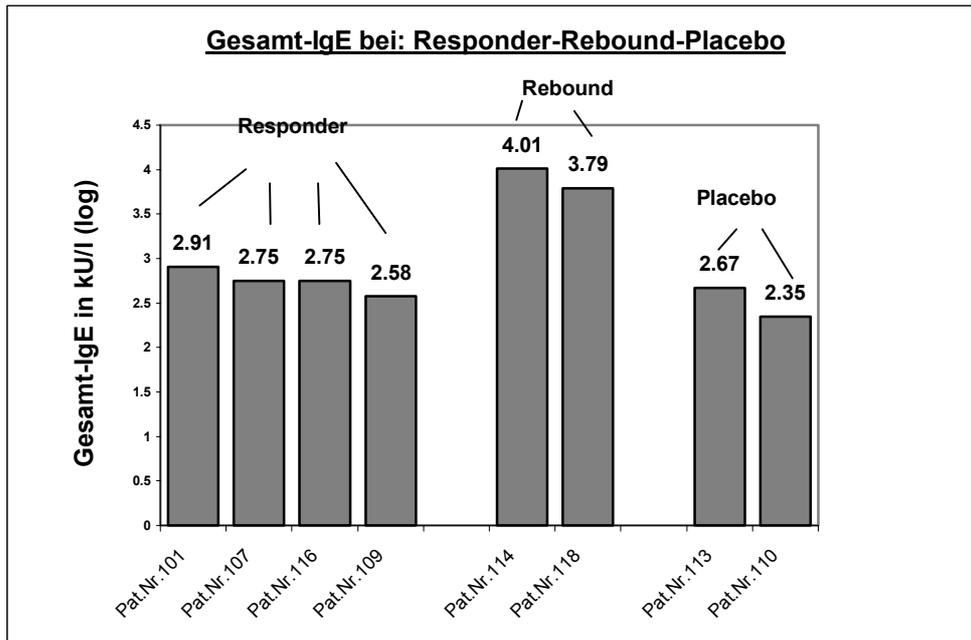
Die mit FK-506 behandelten Patienten gaben alle zu Anfang der Behandlung ein kurz andauerndes, brennendes „Hitzegefühl“ am Ort der Applikation an. Eine leichte Rötung konnte dabei selten beobachtet werden. Die unangenehme Empfindung nahm zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe der Behandlungszeit ab.

**Tab.6** Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse vor Behandlung und zum Zeitpunkt der Biopsie.  
Einteilung in die Gruppen: ‚Responder‘(4), ‚Rebound‘(2), ‚Placebo‘(2) und ‚Other‘(2)

Pat. (Nr.)	Therapie	Gruppe	Score -vorher-	Score -bei Biopsie-	Behandlungs- dauer
107	0,03%FK	responder	6	1	7d
109	0,03%FK	responder	3	1	7d
116	0,03%FK	responder	2	1	7d
101	0,1%FK	responder	4	0	14d
118	0,03%FK	rebound	7	4	14d
114	0,3%FK	rebound	3	2	7d
110	placebo	placebo	5	4	7d
113	placebo	placebo	8	5	21d
108	0,3%FK	other (zu kurz)	6	2	2d
119	placebo	other (Besserung)	6	4	21d

### 3.2 Gesamt-IgE

Bei acht Patienten wurde das Gesamt-IgE in kU/l bestimmt. Die Spanne der Werte liegt, bei deutlicher Erhöhung zum Normalwert, von 225 kU/l bis maximal 10222 kU/l. Die folgende logarithmische Darstellung der IgE-Werte zeigt die auffällig erhöhten IgE-Werte bei den Patienten mit einem ‚rebound‘-Phänomen im Vergleich zu den ‚responder‘-Patienten (siehe Abb.3)

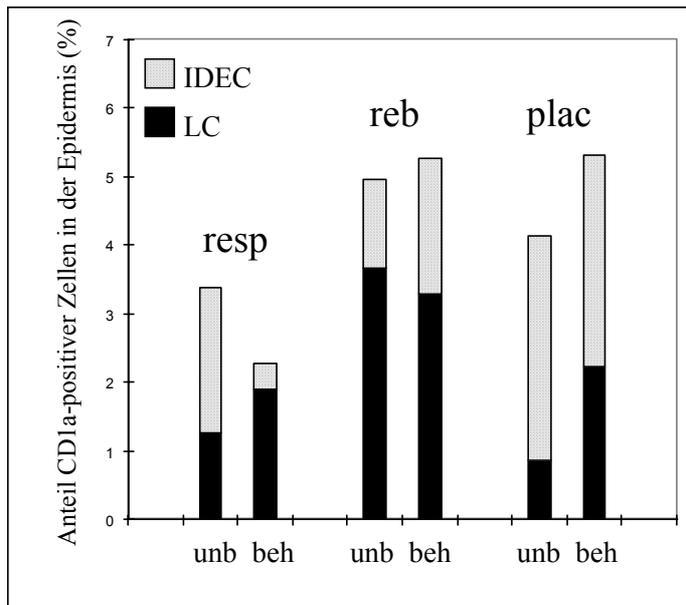


**Abb.3** Vergleich des Gesamt-IgE bei Responder-Rebound-Placebo Patienten: bei den Patienten aus der ‚Rebound-Gruppe‘ ist der Serum Gesamt-IgE Wert im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöht

### 3.3 Zelluläre Ergebnisse

#### 3.3.1 Verminderung der IDEC-Population der DC nach Tacrolimusbehandlung

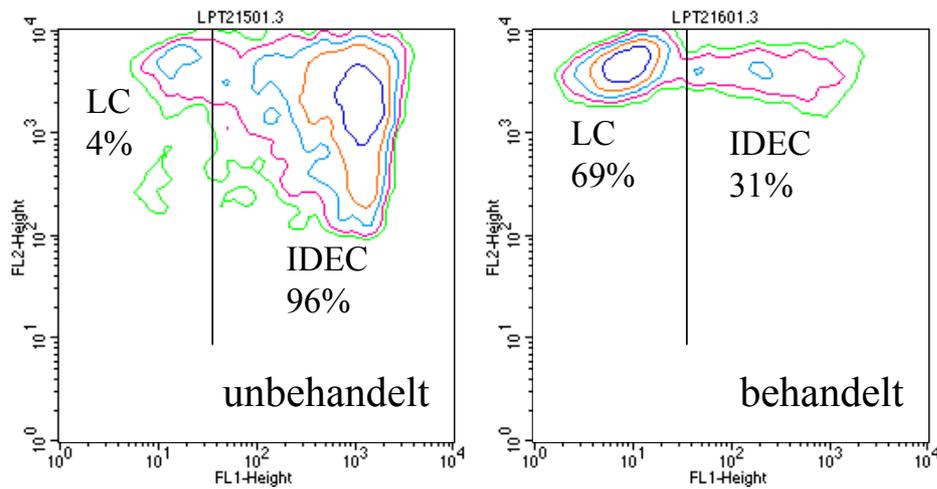
Während in normaler, nicht erkrankter Haut die epidermalen DC etwa 1-2% aller epidermalen Zellen ausmachen, verändert sich die Verteilung bei entzündlichen Hauterkrankungen. Ein Anstieg des prozentualen Anteils von epidermalen DC bei entzündlichen Hauterkrankungen wie dem AE konnte anhand der Immunhistochemie demonstriert werden [6]. Anhand der FACS-Analyse wurde die CD1a positive Population vor und nach Behandlung mit Tacrolimus, quantitativ dargestellt (siehe Abb.4)



**Abb.4** Prozentuale Anteile CD1a-positiver epidermaler DC in einem unbehandelten (unbehandelt,unb) und einem behandelten (behandelt,beh) Areal. Während sich die CD1a positive Zellpopulation nach Tacrolimusbehandlung bei ansprechenden ‘responder’-Patienten (resp, n=4) stark rückläufig zeigte, war dieser Effekt bei schlecht ansprechenden ‘rebound’-Patienten (reb, n=2) nicht nachweisbar. Die Placebo-behandelten Patienten (plac, n=2) wiesen ebenfalls keine Verminderung auf.

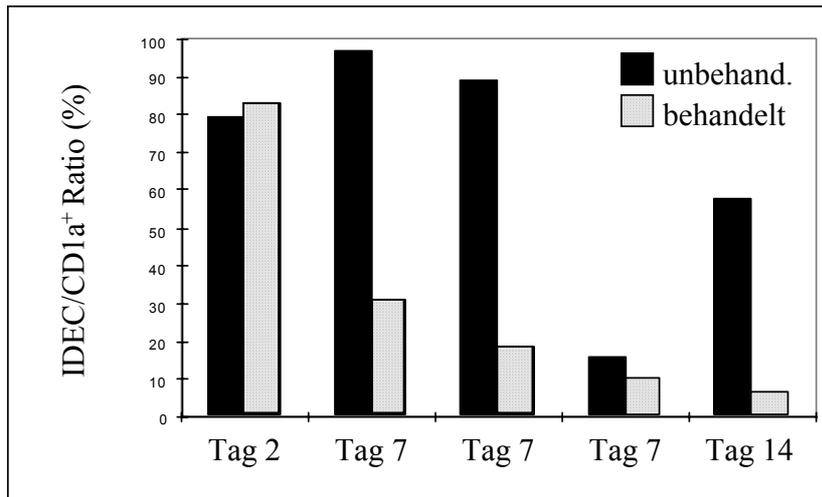
Bei den Patienten, die eine klinische Besserung nach Tacrolimusbehandlung zeigten, konnte eine Verminderung der CD1a positiven Zellpopulation von  $3.4 \pm 0.6\%$  auf  $2.3 \pm 0.1\%$  beobachtet werden. Dies entspricht normaler Haut [6]. Bei den Rebound-Patienten oder bei den mit Placebo behandelten Patienten konnte keine entsprechende Veränderung beobachtet werden. Bei den mit Placebo behandelten Patienten lagen die Ergebnisse bei  $4.1 \pm 2.1\%$  und  $5.3 \pm 0,8\%$ , was sich deutlich von den prozentualen Ergebnissen von tacrolimusbehandelten Responder-Patienten unterscheidet. Im Vergleich zur Responder-Gruppe zeigen die Kontrollpatienten keine Veränderung der IDEC-Population. Die Verminderung der CD1a-positiven Zellpopulation beruht bei der Responder-Gruppe also vor allem auf den Rückgang von IDEC in entzündlicher Haut. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Verminderung der CD1a-positiven Zellen mit der Tacrolimusbehandlung assoziiert ist.

Anhand von Darstellungen im Dotplot wurden die Populationen von LC und IDEC über ihre CD11b-Expression quantitativ abgegrenzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach einer klinisch erfolgreichen Tacrolimusbehandlung, die IDEC-Population, welche aus einer 7 Tage lang mit 0,03% Tacrolimus-haltiger Salbe behandelten, läsionalen Haut isoliert wurde, deutlich vermindert ist (siehe Abb.5).



**Abb.5** Contour plot Analyse mit prozentualer Verteilung der LC und IDEC-Zellpopulationen vor und nach erfolgreicher Tacrolimusbehandlung. Die IDEC zeigen nach Tacrolimusbehandlung eine deutliche Verminderung von 96% auf 31%. (FI-1~CD11b; FI-2~CD1a)

Der Rückgang der IDEC unter der Therapie scheint von der Behandlungsdauer abhängig zu sein. Während nach 2 Behandlungstagen noch kein Effekt sichtbar war, wurde der deutlichste Rückgang nach einer zweiwöchigen Behandlung gesehen. Das folgende Bild zeigt für alle erfolgreich mit Tacrolimus behandelten Patienten diese Abhängigkeit des Rückgangs der IDEC von der Behandlungsdauer (Abb.6).



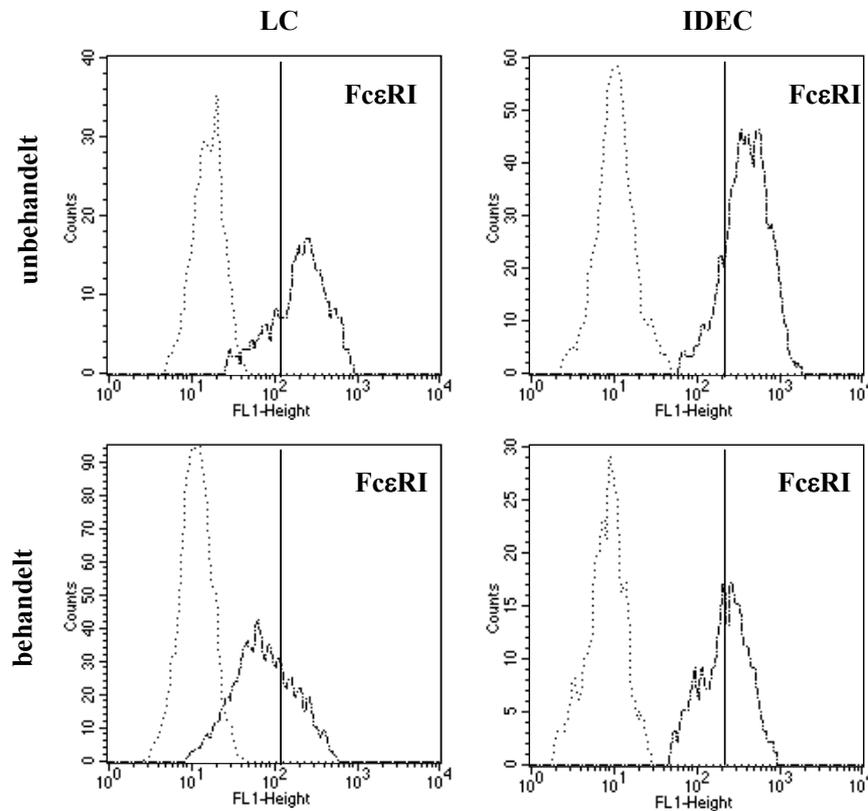
**Abb.6** Anteil der IDEC an den CD1a-positiven epidermalen DC bei den n=5 auf die Behandlung ansprechenden ‚responder‘ Patienten mit AE. Jeder Doppelbalken entspricht einen Patienten. Der Anteil IDEC im behandelten und unbehandelten Areal ist nach der Behandlungsdauer aufgeschlüsselt. Während am 2.Tag noch kein Rückgang der IDEC erkennbar ist, ist dieser am Tag 14 am stärksten.

### 3.3.2 Reduktion der FcεRI Expression nach Tacrolimus

Der prozentuale Anteil CD1a-positiver Zellen in entzündlichen Läsionen des AE war nach Behandlung mit Tacrolimus vermindert. Dies ist hauptsächlich auf einen Rückgang der IDEC zurückzuführen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI, welcher eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des AE darstellt, besonders auf IDEC deutlich erhöht ist [52]. Bei unseren Untersuchungen konnte mittels FACS-Analyse eine deutliche Reduktion des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI nach Behandlung mit Tacrolimus beobachtet werden. Während die FcεRI-Expression auf CD1a-positiven Zellen un behandelter Patienten im Bereich von  $rFI=30.0 \pm 6.6$  lag, zeigte sich in der Responder-Gruppe eine deutliche Verminderung auf  $7.6 \pm 1.2$ . Obwohl die Expression auch auf den LC vermindert war, zeigte sich der deutliche Unterschied vor allem durch die entsprechende Reduktion der IDEC-Population. Das Verhältnis von FcεRI/FcγRII wurde dementsprechend während der Behandlung mit Tacrolimus reduziert. Dieses Verhältnis ist ein signifikanter Marker für das unbehandelte AE [54]. Entsprechende Veränderungen aus der Placebo-behandelten Gruppe konnten nicht verzeichnet werden.

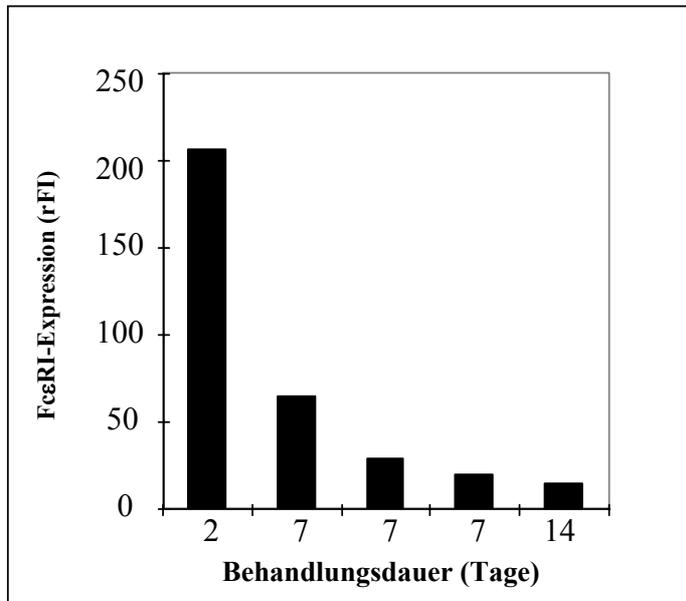
Für die folgenden Histogramm-Plots wurden epidermale Zellsuspensionen aus einem mit Tacrolimus behandelten (7 Tage) und dem kontralateralen, unbehandelten Hautareal mit AE hergestellt. Die durchflußzytometrische Bestimmung der FcεRI-Expression zeigt eine

Reduktion der FcεRI-Expression der behandelten Läsion im Vergleich zum unbehandelten Areal bei einem ‘responder’-Patienten mit AE (siehe Abb.7).



**Abb.7** Histogram-Plots zum Vergleich der FcεRI-Expression auf LC und IDEC mit und ohne Tacrolimusbehandlung eines ‘responder’- Patienten mit AE. Die FcεRI-Expression ist nach der Behandlung vermindert.

Interessanterweise konnte eine von der Behandlungszeit abhängige Reduktion der FcεRI-Expression beobachtet werden. Die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI auf epidermalen DC bei den n=5 ‘responder’-Patienten zeigte eine kennzeichnende Veränderung in Abhängigkeit zur Dauer der Behandlung. Die Epidermis des Patienten mit der längsten Behandlungszeit von 14 Tagen zeigte die niedrigste Expression. Dies lässt vermuten, dass die zellulären Veränderungen gezielt in Richtung einer Wiederherstellung der ursprünglichen ‚nicht-entzündlichen‘ zellulären Hautbeschaffenheit bzw. Zellverteilung gerichtet ist (siehe Abb.8).



**Abb.8** Darstellung der FcεRI-Expression auf CD1a-positiven epidermalen DC bei n=5 'responder'-Patienten in Abhängigkeit zur Behandlungszeit. Die Epidermis des Patienten mit der längsten Behandlungszeit von 14 Tagen zeigt die niedrigste FcεRI-Expression.

### 3.3.3 Normalisierung des gesamten entzündlichen Milieus in der Dermis nach Tacrolimusbehandlung

Das entzündliche Infiltrat beim AE besteht aus mononukleären Zellen. Um die entzündlichen Veränderungen der Dermis nach Tacrolimusbehandlung besser zu beurteilen, wurden Hautproben eines einzigen Patienten entnommen. Die Hautproben wurden in ‚unbefallen‘, ‚befallen-behandelt‘ und ‚befallen-unbehandelt‘ eingeteilt und verglichen. Die Untersuchung beschränkte sich auf die Entzündungsmarker CD11b und CD36 und dem LC spezifischen Marker CD1a. Wie die Tabelle (siehe Tab.7) erkennen lässt, kann eine deutliche Erhöhung von CD11b positiven und CD36 positiven Zellen in der Zellsuspension von befallener Haut vor der Tacrolimusbehandlung beobachtet werden. Nach der topischen Behandlung mit Tacrolimus zeigt sich eine Verminderung dieser Population, wobei CD11b positive Zellen wieder im Bereich von nicht befallener Haut liegen und CD36 positive Zellen um etwa 38% zurückgehen.

**Tab.7** Immunhistochemische Analyse von nicht befallener Haut und befallener Haut vor und nach Tacrolimustherapie: Veränderungen des entzündlichen Infiltrats der Dermis in Abhängigkeit von FK-506 Behandlung. Die Ergebnisse sind als Anzahl positiver Zellen pro  $\mu\text{m}^2$  Fläche beschrieben

	Nicht befallene Haut (Anzahl der Zellen/ $\mu\text{m}^2$ )	Befallene Haut	
		vor FK-506 (Anzahl der Zellen/ $\mu\text{m}^2$ )	nach FK-506 (Anzahl der Zellen/ $\mu\text{m}^2$ )
<b>CD1a</b>	10.70 $\pm$ 4.16	10.7 $\pm$ 1.6	16.3 $\pm$ 2.02
<b>CD11b</b>	13.67 $\pm$ 1.6	20.67 $\pm$ 5.03	12.3 $\pm$ 1.5
<b>CD36</b>	3.67 $\pm$ 0.58	21.3 $\pm$ 2.53	13.3 $\pm$ 2.0

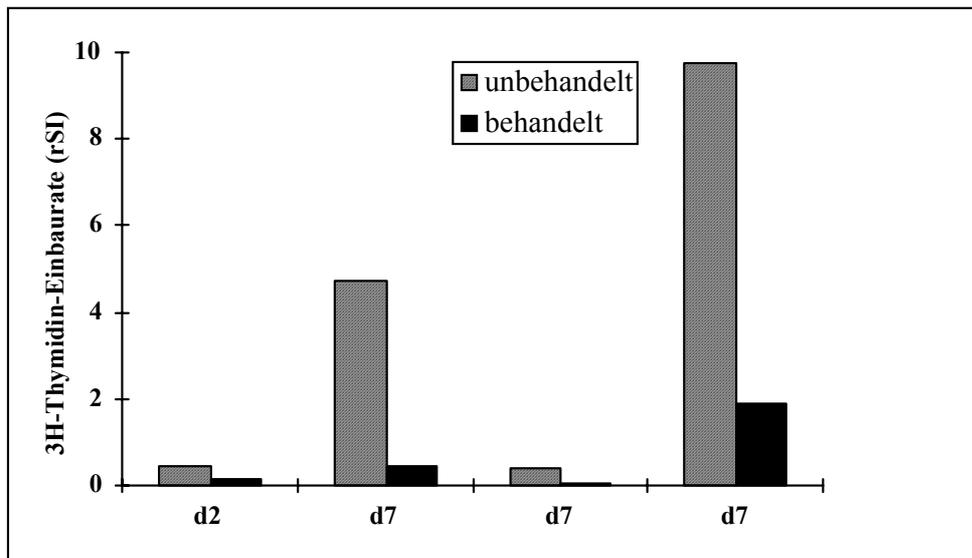
Anhand der immunhistochemischen Analyse jeweils der Dermis und Epidermis konnten wir in den verschiedenen Gefrierschnitten Unterschiede in der Markerexpression erkennen (Tab.8). Die topische Anwendung von Tacrolimus führte zu einem kompletten Rückgang der CD11b+ und CD36+ Zellen in der Epidermis und eine Verminderung aus dem Bereich der Dermis.

**Tab.8** Immunhistochemischer Vergleich von Dermis und Epidermis nicht befallener und befallener Haut vor und nach Tacrolimustherapie: kompletter Rückgang von CD11b+ und CD36+ Zellen in der Epidermis und Verminderung in der Dermis

	Dermis			Epidermis		
	unbefallen	befallen		unbefallen	befallen	
		unbehandelt	behandelt		unbehandelt	behandelt
<b>CD1a</b>	++	+/-	++	++	+++	++
<b>CD11b</b>	+/-	+++	+	0	+	0
<b>CD36</b>	+	+++	+	0	+	0
<b>Fc<math>\epsilon</math>RI</b>	+	+/-	+	+	+++	+

### **3.3.4 Reduktion der Aktivierungsfähigkeit von epidermalen DC nach Behandlung mit Tacrolimus**

Aufgabe der epidermalen Zellen ist es, unter Ausnutzung ihres dichten Netzwerkes im Epithel, Antigene anhand der entsprechenden Rezeptoren abzufangen und zur weiteren Prozessierung an die T-Zellen zu präsentieren. Die Aktivierung bzw. Stimulation von T-Zellen ist in diesem Zusammenhang eine wichtige Aufgabe, die in den parakortikalen Zonen der Lymphknoten stattfindet. Diese stimulative Fähigkeit auf autologe Lymphozyten kann anhand von epidermalen Zellsuspensionen mit der sog. SMLR gemessen werden. Die Zellsuspensionen für diese Untersuchung entstanden aus behandelter und unbehandelter Haut von vier Patienten. Eine Hautbiopsie wurde nach 2 Tagen Behandlungszeit und die weiteren drei Biopsien nach 7 Tagen Behandlungszeit entnommen. Die Zellsuspensionen wurden als Stimulatorzellen in einer gemischten Haut-Lymphozyten-Kultur eingesetzt. Als Stimulationsindex (rSI) gilt die gemessene Rate des Thymidineinbaus in den entsprechenden Kulturen von behandelter und unbehandelter Haut. Somit konnte festgestellt werden, dass die Zellsuspensionen unbehandelter Haut aller untersuchten Patienten eine höhere Stimulation gegenüber den autologen Lymphozyten zeigten als die Zellsuspensionen nach Tacrolimusbehandlung. Die Verminderung der stimulativen Fähigkeit der Zellen nach Tacrolimusbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen variiert in einem Bereich von 64% bis 90% (siehe Abb.9). Wie bereits gezeigt, erfolgte nach der Tacrolimustherapie eine deutliche Verminderung der IDEC-Population im entzündlichen Infiltrat. Somit fällt auf, dass der Patient mit der stärksten klinischen Besserung (Pat.107) bei der Score-Bewertung, sowohl die größte Reduktion der IDEC-Population zeigt (von 97% auf 31%), als auch den stärksten Rückgang der stimulativen Kapazität (90%). Die Zellsuspension des Patienten mit der geringsten Behandlungszeit von 2 Tagen zeigte den geringsten Rückgang (64%) der stimulativen Kapazität. Dieser zeigte jedoch auch eine leichte prozentuale Erhöhung der IDEC-Population in der behandelten Läsion im Vergleich zur unbehandelten Läsion. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Veränderung der Stimulationskapazität eventuell von der Therapiedauer abhängt. Die zwei weiteren Patienten zeigten im klinischen Verlauf nach initialer Besserung einen Rückfall auf. Ihre Stimulationskapazität wurde um 88% und 80% gesenkt, während die IDEC-Population prozentual von 64% auf 49% und von 22% auf 16%, trotz Reboundeffekts zurückging. Unabhängig von ihrem klinischen Verlauf aber entsprechend des Verhaltens der jeweiligen IDEC-Population, demonstrierten alle vier Patienten einen Rückgang ihrer Stimulationskapazität auf autologe T-Zellen.



**Abb.9** Reduktion der Stimulationskapazität epidermaler Zellen auf autologe T-Zellen nach Tacrolimus in Abhängigkeit von der Therapiedauer. Die Thymidininkorporation ist als relativer Stimulationsindex (rSI) dargestellt.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Veränderungen eine topische Tacrolimustherapie in Abhängigkeit von der individuellen klinischen Besserung auf die epidermalen dendritischen Zellpopulationen ausübt.

Das klinische Ansprechen auf eine topische Tacrolimusbehandlung war mit einem Rückgang der Anzahl CD1a-positiver DC im epidermalen Kompartiment assoziiert. Die Untersuchung der beiden Subpopulationen LC und IDEC ergab, dass dieser Rückgang vor allem auf die deutliche Verminderung der IDEC nach Tacrolimusbehandlung zurückzuführen ist. Außerdem konnten sowohl quantitative Veränderungen des entzündlichen Infiltrats in der Dermis und Epidermis, Verminderung der hochaffinen IgE-Rezeptorexpression als auch Funktionsveränderungen innerhalb der epidermalen DC beobachtet werden.

Nicht nur vom klinischen Aspekt, sondern auch vom histologischen Bild und von der immunologischen Reaktion her kann das AE als eine IgE-vermittelte TypIV-Reaktion angesehen werden. Eine besondere Rolle spielen bei diesem Reaktionstyp die antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen, die somit auch ein Ziel neuer Behandlungsansätze darstellen [11, 28]. Die Antigenaufnahme über FcεRIα-exprimierende DC und die anschließende Immunantwort scheint für die Entstehung des AE wesentlich und damit ein vielversprechender Interventionspunkt neuer Behandlungsansätze zu sein [5].

Durch unterschiedliche phänotypisch ultrastrukturelle Eigenschaften innerhalb der Gruppe der CD1a-positiven DC konnten zwei Subpopulationen, nämlich die LC und IDEC aus atopischer Haut identifiziert werden [52]. Beide stellen mögliche Angriffspunkte für neue Therapeutika dar, wobei Effekte durch direkte Einwirkung auf den hochaffinen IgE-Rezeptor oder durch Verminderung der Simulationskapazität der antigenpräsentierenden Zellen diskutiert werden [5].

Wir untersuchten den Einfluss einer topischen Tacrolimustherapie auf die Zellzahl, den Immunphänotyp und die Funktion der CD1a-positiven Zellpopulationen aus atopischer Haut. Wir konnten schließlich zeigen, dass die topische Behandlung mit Tacrolimus zu einer Veränderung des epidermalen CD1a-positiven Zellinfiltrats bezüglich Qualität, Quantität und Funktion führt.

Klinisch konnte eine deutliche Besserung des Hautzustandes innerhalb kurzer Behandlungszeit mit relativ guter Verträglichkeit von Tacrolimus verzeichnet werden. Bei den Patienten mit klinischer Besserung konnte ein allgemeiner Rückgang der CD1a-positiven Zellen im epidermalen Kompartiment beobachtet werden. Die experimentelle Untersuchung der CD1a-positiven Subpopulationen IDEC und LC im Verhältnis hat gezeigt, dass dieser

Rückgang vor allem durch eine Verminderung der IDEC-Population im entzündlichen Infiltrat verursacht wird. Ob der Rückgang der IDEC auf einer Auswanderung dieser Zellen oder einer Apoptose der IDEC beruht, ist bisher ungeklärt. Der allgemeine Rückgang der CD1a-positiven Zellen auf bis zu 2 % innerhalb der Epidermis bei klinischer Besserung nach Tacrolimus entspricht dem eines normalen Hautmilieus.

Eine weitere Veränderung von entscheidender Bedeutung war die Beobachtung einer Reduktion der FcεRIα-Expression der epidermalen IDEC- und LC-Population. Da die FcεRIα-Expression mit einer entsprechenden Heraufregulierung krankheitsspezifisch ist [53] und der Antigenpräsentation durch den FcεRIα eine zentrale Bedeutung für die Entstehung des AE beigemessen wird [5], ist diese Beobachtung von großer klinischer Relevanz. Ob Tacrolimus auf die Rezeptorexpression direkt einwirkt und diese somit reduziert oder ob der Effekt indirekt durch Mediatoren erfolgt, ist derzeit noch unklar. Neuere Untersuchungen lassen eine direkte Herunterregulation der FcεRIα-Expression anstatt einer durch Mediatoren vermittelten Medikamentenwirkung vermuten [36].

Als weitere begleitende zelluläre Reaktion wurde bei der Patientengruppe mit klinischer Besserung nach Tacrolimusbehandlung eine Verminderung der CD36-Expression auf epidermalen CD1a-positiven Zellen in läsionaler Haut verzeichnet. Die Expression von CD36 auf CD1a-positiven Zellen ist mit entzündlicher Aktivität im epidermalen Kompartiment assoziiert [53]. Interferon-γ ist als induzierender Faktor für CD36 bekannt und in entzündlicher Epidermis des AE vorhanden [19, 22]. Die Anwesenheit von Interferon-γ ist ein Marker für den klinischen Verlauf des AE. Während eine direkte Verminderung der CD36-Expression auf LC und IDEC nach Tacrolimusbehandlung beobachtet werden konnte, wird die Verminderung durch den IDEC-Rückgang verstärkt. CD36 wird nämlich auf IDEC besonders stark exprimiert. Die deutliche Reduktion von IDEC wirkt sich somit direkt quantitativ auf CD36 und auf das entzündliche Milieu aus.

Auch die Dermis zeigt Veränderungen des entzündlichen Infiltrats nach Tacrolimusbehandlung. Während befallene-unbehandelte Haut durch die Anwesenheit von CD11b+ und CD36+ Zellen hauptsächlich perivasal in der papillären Dermis gekennzeichnet ist, zeigt die unbefallene Haut nur eine geringe Anzahl dieser Zellen. Vermutlich kommt es zu einer Migration dieser Zellen, abhängig vom entzündlichen Hautzustand. Nach topischer Tacrolimusbehandlung kommt es zu einer deutlichen Verminderung von CD11b+ und CD36+ aus der Epidermis und der papillären Dermis, vermutlich durch eine Abwanderung dieser Zellen.

Untersuchungen an Tieren und Menschen haben gezeigt, dass Tacrolimussalbe die efferente Phase der Entstehung eines allergischen Kontaktekzems hemmt [25, 26]. Die Annahme, dass die Stimulationskapazität der antigenpräsentierenden Zellen durch topische Anwendung von Tacrolimus beeinflusst wird, wird zunehmend durch diese und unsere eigenen Untersuchungen erhärtet.

Taylor et al. berichten über CD1a+, CD1b+ und CD 36+ LC, die in entzündlicher Haut von Patienten mit AE eine starke stimulative Aktivität gegenüber autologen T-Zellen aufweisen [45]. Bei unserer Untersuchung konnte eine deutliche Verminderung dieser Stimulationskapazität nach topischer Tacrolimusbehandlung festgestellt werden – dieser Effekt ist von entscheidender Wichtigkeit und ruft die Frage nach der genauen Wirkungsweise von Tacrolimus bei der kutanen Immunantwort in Erinnerung. Ob die Stimulationsaktivität durch eine Verminderung des Gesamtpools der CD1a-positiven DC und somit durch eine Reduktion der vorrangigen Stimulationsfraktion hervorruft, ist fraglich. Die Verminderung der Stimulationskapazität wurde in einem Fall nämlich bereits am 2.Tag gesehen, obwohl sich bei diesem Patienten noch keine Veränderungen im entzündlichen dendritischen Zellpool gezeigt hatten. Tacrolimus scheint in der Wirkungsweise dem Cyclosporin [14, 16] ähnlich zu sein, welches die Stimulationskapazität von LC und verwandten DC durch Modulation von co-stimulatorischen Molekülen beeinflusst [36]. Zu beachten sind jedoch Unterschiede zwischen der Wirkungsweise von Cyclosporin A und Tacrolimus [17].

Zusammenfassend wird die klinische Besserung des Hautzustandes beim Atopiker nach topischer Tacrolimusbehandlung von einer deutlichen zelluären Veränderung hinsichtlich der Qualität, Quantität und Funktion des epidermalen dendritischen Zellinfiltrats begleitet. Die Reduktion der Stimulationskapazität epidermaler Zellen durch Tacrolimus deutet auf einen entscheidenden Einfluss dieser Substanz auf zellulärer Ebene hin. Nicht nur phänotypische Veränderungen der LC- und IDEC-Populationen konnten verzeichnet werden, sondern auch eine gravierende Depletion der IDEC-Population aus dem Pool der CD1a-positiven epidermalen DC. Zu beachten ist, dass die Verringerung des Anteils CD1a-positiver Zellen auf eine Verminderung der IDEC beruht. Die LC sind jedoch weiterhin präsent und behalten ihre Aufgabe als Immunvorposten der Haut bei. Außerdem dürfte die schnelle Wirksamkeit von Tacrolimus die Behandlungsdauer deutlich verkürzen und dadurch das immunsuppressive Risiko vermindern. Durch diese Arbeit lässt sich schließlich zeigen, dass antigenpräsentierende DC eine Zielstruktur bei topischen Tacrolimustherapie des AE darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Das atopische Ekzem ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung mit charakteristischem klinischem Bild, steigender Inzidenz und großer sozialmedizinischer Bedeutung, die Kinder und Erwachsene betrifft. Viele Patienten weisen erhöhte Serum-IgE-Spiegel auf. Den antigen-präsentierenden dendritischen Zellen der Haut wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Erkrankung zugesprochen. Während die normale Epidermis nur eine dendritische Zellpopulation enthält, ist in der entzündlich veränderten Haut des atopischen Ekzems zusätzlich zu den Langerhans Zellen eine zweite epidermale dendritische Zellpopulation nachweisbar – die inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen. Beide Zelltypen exprimieren hochaffine IgE-Rezeptoren, die für die IgE-vermittelte Präsentation von Allergenen von zentraler Bedeutung sind. Eine äußerliche Behandlung mit Glukokortikosteroidexterna ist die Standardtherapie für die meisten Patienten. Die äußerliche Anwendung des Makrolaktams Tacrolimus könnte eine therapeutische Alternative darstellen, wobei als Wirkmechanismus die Hemmung der Sekretion NF-AT-abhängiger proinflammatorischer Zytokine durch T-Zellen bereits gut untersucht ist.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, erstmalig mögliche Auswirkungen einer topischen Tacrolimus-Therapie auf die dendritischen Zellen der läsionalen Haut zu erfassen. Hierzu wurden zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten zeitgleich Hautproben aus behandelten und unbehandelten Läsionen entnommen. Diese wurden mittels immunhistochemischer Analyse, durchflußzytometrischer Immunphänotypisierung epidermaler dendritischer Zellsuspensionen sowie gemischter Haut-Lymphozyten-Reaktion untersucht.

Die Ergebnisse bestätigten, dass unbehandelte Läsionen viel mehr CD1a+ Zellen enthielten als normale Haut, was vor allem durch die Vermehrung der inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen bedingt war. Bei klinischer Besserung der Hautareale unter topischer Behandlung mit Tacrolimus war die Anzahl inflammatorischer dendritischer epidermaler Zellen im behandelten Areal vermindert. Die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors war im behandelten Areal sowohl auf Langerhans Zellen als auch auf inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen reduziert. Die Expression von CD36, die mit der entzündlichen Aktivität assoziiert ist, war in den behandelten Hautproben ebenfalls vermindert. Die gemischte Haut-Lymphozyten-Reaktion zeigte, dass die Stimulationsfähigkeit der epidermalen dendritischen Zellen gegenüber autologen T-Zellen zurückging.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gruppe der antigen-präsentierenden dendritischen Zellen ein Angriffspunkt für eine topische Tacrolimustherapie darstellt. Ob die verminderte Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors auf diesen Zellen auf einer direkten Beeinflussung der Rezeptorregulation oder auf einen indirekt vermittelten Effekt beruht, ist noch unklar. Fraglich ist auch, ob die Verminderung der epidermalen dendritischen Zellen durch apoptotischen Zelltod oder durch Auswanderung erfolgt. Weitere Studien und insbesondere Reihenuntersuchungen müssen Fragen über den genauen Zeitablauf dieser zellulären Ereignisse im Verlauf der Behandlung klären.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Alaiti S, Kang S, Fiedler V, Ellis C, Spurlin D, Fader D, Ulyanov G, Gadgil S, Tanase A, Lawrence I, Scotellaro P, Raye K, Bekersky I (1998) Tacrolimus (FK506) ointment for atopic dermatitis: a phase I study in adults and children. *J Am Acad Dermatol* 38: 69-76
2. Berman B, Chen V, France D, Dotz W, Petroni G (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* 109: 553-8
3. Bieber T (1992) IgE-Rezeptoren auf Langerhans-Zellen. Ein Bindeglied zwischen der Umwelt und dem Immunsystem? *Hautarzt* 43: 753-62
4. Bieber T (1994) Fc epsilon RI on human Langerhans cells: a receptor in search of new functions. *Immunol Today* 15: 52-3
5. Bieber T (1997) Fc epsilon RI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 18: 311-3
6. Bieber T, Dannenberg B, Prinz J, Rieber E, Stolz W, Braun-Falco O, Ring J (1989) Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema: a study of the time course of the lesions and with regard to the IgE serum level. *J Invest Dermatol* 93: 215-9
7. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz J, Rieber E, Boltz-Nitulescu G, Schreiner O, Kraft D, Ring J, Stingl G (1989) Induction of Fc epsilon RII/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant Interleukin-4 and gamma interferon. *J Exp Med* 170: 309-14
8. Boguniewicz M (1997) Advances in the understanding and treatment of atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr* 9: 577-81
9. Bornhövd E, Burgdorf W, Wollenberg A (2001) Macrolactam immunomodulators for topical treatment of inflammatory skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 45: 736-43
10. Bornhövd E, Schuller E, Bieber T, Wollenberg A (2000) Immunsuppressive Makrolide und ihr Einsatz in der Dermatologie. *Hautarzt* 51: 646-54

11. Bos J, Kaspenberg M, Smitt J (1994) Pathogenesis of atopic eczema. *Lancet* 343: 1338-41
12. Cooper K (1994) Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 102: 128-37
13. Dermatitis ETFoA (1993) Severity Scoring of Atopic Dermatitis: The SCORAD Index. *Dermatology* 186: 23-31
14. Dupuy P, Bagot M, Michel L, Descourt B, Dubertret L (1991) Cyclosporin A inhibits the antigen-presenting functions of freshly isolated human Langerhans cells in vitro. *J Invest Dermatol* 96: 408-13
15. Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2541-4
16. Furue M, Katz S (1988) The effect of cyclosporine on epidermal cells. I. Cyclosporine inhibits accessory cell functions of epidermal Langerhans cells in vitro. *J Immunol* 140: 4139-43
17. Geba G, Ptak W, Askenase P (2001) Topical tacrolimus and cyclosporin A differently inhibit early and late effector phases of cutaneous delayed-type and immunoglobulin E hypersensitivity. *Immunology* 104: 235-42
18. Gounni A, Lamkhioed B, Delaporte E, Capron A, Kinet J, Capron M (1994) High-affinity IgE receptor on eosinophiles is involved in defence against parasites. *Nature* 367: 183-6
19. Grewe M, Gyufko K, Schoepf E, Krutmann J (1994) Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 343: 25-6
20. Haas N, Hamann K, Grabbe J, Niehus J, Kunkel G, Kolde G, Czarnetzki B (1997) Demonstration of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on Langerhans' cells of diseased nasal mucosa. *Allergy* 52: 436-9
21. Hanifin J, Rajka G (1980) Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Venerol. (Stockh.) Suppl.* 92: 44-7

22. Johnson J, Swerlick R, Grady K, Millet P, Wick T (1993) Cytoadherence of plasmodium falciparum-infected erythrocytes to microvascular endothelium is regulatable by cytokines and phorbol ester. *J Infect Dis* 167: 698-703
23. Kraft S, Weßendorf J, Hanau D, Bieber T (1998) Regulation of the high affinity receptor for IgE on human epidermal langerhans cells. *The Journal of Immunology* 161: 1000-6
24. Lauerma A, Maibach H (1994) Topical FK506--clinical potential or laboratory curiosity? *Dermatology* 188: 173-6
25. Lauerma A, Maibach H, Granlund H, Erkkö P, Kartamaa M, Stubb S (1992) Inhibition of contact allergy reactions by topical FK 506. *Lancet* 340: 556
26. Lauerma A, Stein B, Homey B, Lee C, Bloom E, Maibach H (1994) Topical FK506: suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. *Arch Dermatol Res* 286: 337-40
27. Lauerma A, Surber C, Maibach H (1997) Absorption of topical tacrolimus (FK506) in vitro through human skin: comparison with cyclosporin A. *Skin Pharmacol* 10: 230-4
28. Leung D (1995) Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 96: 302-18
29. Leung D (1999) Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 104: 99-108
30. Leung D (2000) Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 105: 860-76
31. Leung D (2001) Atopic dermatitis and the immune system: The role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol* 45: S13-6
32. Liu F, Albrandt K, Mendel E, Kulczycki J, A, Orida N (1985) Identification of an IgE-binding protein by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4100-4
33. Maurer D, Fiebiger E, Ebner C, Reininger B, Fischer G, Wichlas S, Jouvin M, Schmitt-Egenolf M, Kraft J, Kinet P, Stingl G (1996) Peripheral blood dendritic cells express

- FcepsilonRI as a complex composed of FcepsilonRI alpha- and FcepsilonRI gamma chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 157: 607
34. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolffwiniski B, Jouvin M, Kilgus O, Kinet J, Stingl G (1994) Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 179: 745-50
35. Metzger H (1992) The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev* 125: 37
36. Panhans-Gross A, Novak N, Kraft S, Bieber T (2001) Human epidermal Langerhans' cells are targets for the immunosuppressive macrolide tacrolimus (FK-506). *J Allergy Clin Immunol* 107: 345-52
37. Rajka G (1989) Essential aspects of atopic dermatitis. Springer, Berlin
38. Rajka G, Langeland T (1989) Grading of the severity of atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol (Stockh) Suppl* 144: 13-4
39. Reitamo S, Rissanen J, Remitz A, Granlund H, Erkkö P, Elg P, Autio P, Lauerma A (1998) Tacrolimus ointment does not affect collagen synthesis: results of a single-center randomized trial. *J Invest Dermatol* 111: 396-8
40. Reitamo S, Wollenberg A, Schopf E, Perot J, Marks R, Ruzicka T, Christophers E, Kapp A, Lahfa M, Rubins A, Jablonska S, Rustin M (2000) Safety and efficacy of 1 year of tacrolimus ointment monotherapy in adults with atopic dermatitis. The European Tacrolimus Ointment Study Group. *Arch Dermatol* 136: 999-1006
41. Ruzicka T, Bieber T, Schoepf E, Rubins A, Dobozy A, Bos J, Jablonska S, Ahmed I, Thestrup-Pedersen K, Daniel F, Finzi A, Reitamo S (1997) A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *N Engl J Med* 337: 816-21
42. Schaefer-Korting M, Schmid M, Korting H (1996) Topical Glucocorticoids with improved risk-benefit ratio: rationale of a new concept. *Drug Saf* 14: 375-85

43. Schmid-Grendelmeier P, Simon D, Simon H-U, Akdis C, Wütrich B (2001) Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy* 56: 841-9
44. Steinman R (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9: 271-96
45. Taylor R, Baadsgaard O, Hammerberg C, Cooper K (1991) Hyperstimulatory CD1a+CD1b+CD36+ Langerhans cells are responsible for increased autologous T lymphocyte reactivity to lesional epidermal cells of patients with atopic dermatitis. *J Immunol* 147: 3794-802
46. Uehara M (1991) *Dry skin and Inflammation*. Springer, Berlin
47. Wang B, A R, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Födinger D, Kinet J, Stingl G (1992) Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcepsilonRI. *J Exp Med* 175: 1353-65
48. Wollenberg A, Bieber T (2000) Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy* 2000 55: 205-13
49. Wollenberg A, Bieber T (2002) Antigen-Presenting Cells. In: Bieber T, Leung D (Hrsg) *Atopic Dermatitis*. Marcel Dekker, Inc., pp 267-83
50. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu F, Bieber T (1993) Human keratinocytes release the endogenous  $\beta$ -galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 178: 777-85
51. Wollenberg A, Haberstock J, Teichmann B, Wen S-P, Bieber T (1998) Demonstration of the low-affinity IgE receptor FcepsilonRII/CD23 in psoriatic epidermis: inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) but not Langerhans cells are the relevant CD1a-positive cell population. *Arch Dermatol Res* 290: 517-21
52. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic

epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 106: 446-53

53. Wollenberg A, Schuller E (1999) Langerhans-Zellen und Immunantwort. Plewig G, Wolff H (Hrsg) *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*, Springer, Berlin 41-48

54. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1995) Langerhans cell phenotyping: A new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases. *Lancet* 346: 1626-7

55. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1999) Phenotyping of epidermal dendritic cells - clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37: 147-55

## 6 Anhang

### 6.1 **Zusammensetzung der Medien und Lösungen**

#### **Waschmedium (WM):**

Grundmedium: RPMI 1640-Medium (Nr. F1215, seromed)	500 ml
Zu dem Ausgangsmedium wird über einen 0,2µm Sterilfilter hinzu gegeben:	
Inaktiviertes FKS (fetales Kälberserum)	50 ml
nach halbstündiger Erwärmung bei 56°C (Nr.10106-078; GibcoBRL):	
L-Glutamin (Nr. 25030-024, GibcoBRL)	5 ml
Antibiotic/Antimycotic Sol. (Nr. 15240-062; GibcoBRL)	5 ml

#### **Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):**

NaCl (Ref.6400, Merck)	8,0 g
KCl (Ref.4936, Merck)	0,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O (Ref.6580, Merck)	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Ref.4873, Merck)	0,2 g
Aqua dest	ad 1000 ml

**FACS- Puffer:**

unsteriler PBS	1000 ml
Inaktiviertes FKS (fetales Kälberserum)	10 ml
10% Na-Azid-Lsg.(Ref.6688,Merck)	10 ml

Anschließend erfolgt die Einstellung des pHs mit 1M NaOH und 1M HCL auf pH=7,2-7,4 und Verdünnung mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml. Die Lösung wird dann durch einen 0,2µm Filter steril gereinigt.

**0,1% DNase-Lsg:**

PBS	250 ml
DNase bovine (Fa.Sigma, Typ IV)	250 mg

**0,5% Trypsin-Lsg:**

PBS	1000 ml
Trypsin (Fa.Sigma, Typ XI)	5 mg

Die Mischung wurde mit Hilfe des Magnetrührers bis zur Klarheit gelöst und anschließend mit HCl/NaOH auf pH=7,2-7,4 titriert. Die Lösung wurde dann mit einem 0,2µm Sterilfilter gereinigt und zu je 40 ml in Falcon-Röhrchen bei -20°C gelagert.

## **6.2 Danksagung**

Ich möchte mich bei allen sehr herzlich bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und die mich über diese Zeit so freundlich unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Plewig für das Wissen, welches ich an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erlernt habe und für die Forschungsmöglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit.

Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. es. sci. Th. Bieber konnte ich dieses Dissertationsthema mit Hilfe seines Labors und erfahrener Führung untersuchen.

Herrn PD Dr. med. A. Wollenberg möchte ich sehr herzlich danken, da er jederzeit für mich erreichbar war und mich stets bei der Arbeit unterstützt und betreut hat. Mein Forschungswissen verdanke ich seinen geduldigen Erklärungen und seinem großen Interesse an der Forschungsarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Kollegen, Doktoranden und Mitarbeitern des Labors für die freundliche Atmosphäre und den Teamgeist bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Jörg Haberstock, der mir unbegrenzte Hilfe im Labor leistete und mich bei Fehlversuchen nicht verzweifeln lies.

Ich danke meinem Ehemann Sanjay, unseren Eltern und Geschwistern sehr herzlich für das Verständnis und die Unterstützung während der Entstehung dieser Doktorarbeit.

### **6.3 Lebenslauf**

#### *Personalien:*

Name:	Sheena Sharma
Geburtsdatum:	27.02.1971
Geburtsort:	Neu-Delhi, Indien
Eltern:	Naresh K. Sharma, Arzt für Allgemeinmedizin Shakun Sharma, Hausfrau
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet seit 25.12.1998 mit Sanjay Sharma, Betriebswirt

#### *Schule und Studium:*

Juni 1990	Abitur am Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen
Mai 1991	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 1993	Ärztliche Vorprüfung
August 1994	I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1997	II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 1998	III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### *Beruf:*

Januar 1999	Ärztin im Praktikum an der Kinder- und Rheumakinderklinik Garmisch-Partenkirchen
Juli 2000	Assistenzärztin und Rheumaforschung an der Kinder- und Rheumakinderklinik Garmisch-Partenkirchen
Seit Dezember 2000	Volontärarbeit bei Entwicklungshilfe-Projekten im Raum Neu- Delhi, Indien