

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig)**

**Erweiterung eines diagnostischen Verfahrens zur
Differenzierung entzündlicher Dermatosen mittels
Immunphänotypisierung dendritischer Zellen der Epidermis**

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

vorgelegt von
Jörg Haberstok
aus
München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. A. Wollenberg
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. G. Hartmann Priv. Doz. Dr. P. Kufer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	22.01.2004

Für Natalija

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	7
1.1 DAS DIAGNOSTISCHE DILEMMA	7
1.2 DIE ROLLE DER DENDRITISCHEN ZELLEN IN DER EPIDERMIS	8
1.3 DIE ROLLE DER VERSCHIEDENEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLE	11
1.3.1 <i>FcεRI auf dendritischen Zellen</i>	11
1.3.2 <i>FcεRII/CD23</i>	11
1.3.3 <i>β1 Integrine</i>	12
1.3.4 <i>β2 Integrine</i>	12
1.3.5 <i>Fcγ-Rezeptoren</i>	13
1.3.6 <i>Cadherine</i>	13
1.3.7 <i>MHC-Klasse II</i>	14
1.3.8 <i>CD36</i>	14
1.3.9 <i>CD45</i>	14
1.3.10 <i>CD1</i>	15
1.4 FRAGESTELLUNG	16
2 MATERIAL UND METHODIK	17
2.1 AUSWAHL DER PATIENTEN	17
2.2 HERSTELLUNG DER EPIDERMALEN ZELLSUSPENSION	18
2.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	19
2.4 MONOKLONALE ANTIKÖRPER.....	20
2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE.....	21
2.6 TESTUNG DER TRYPSINSENSITIVITÄT.....	22
2.7 REAGENZIEN	22
2.8 STATISTISCHE METHODEN	22
3 ERGEBNISSE	24
3.1 ANTEIL CD1A POSITIVER ZELLEN BEI VERSCHIEDENEN ENTZÜNDLICHEN DERMATOSEN	24
3.2 PHÄNOTYPISIERUNG DES CD1A POSITIVEN ZELLPOOLS IN NORMALER UND IN ENTZÜNDLICHER EPIDERMIS	25
3.2.1 <i>Die IgE Rezeptoren FcεRI und CD23</i>	25
3.2.2 <i>Die IgG Rezeptoren CD16, CD32 und CD64</i>	26
3.2.3 <i>Die β1 Integrine CD49b und CD49d</i>	27
3.2.4 <i>Die β2 Integrine CD11a, CD11b und CD11c</i>	28
3.2.5 <i>Verschiedene CD-klassifizierte Moleküle</i>	29
3.2.6 <i>HLA-DR</i>	30
3.3 VERGLEICH LÄSIONALER UND NICHT- LÄSIONALER HAUT VON PATIENTEN MIT ATOPISCHEM EKZEM MIT NORMALER HAUT	31
3.3.1 <i>Die IgE Rezeptoren</i>	32
3.3.2 <i>Die IgG Rezeptoren</i>	33
3.3.3 <i>Die β1 Integrine CD49b und CD49d</i>	34
3.3.4 <i>Die β2 Integrine CD11a, CD11b und CD11c</i>	35
3.3.5 <i>Verschiedene CD-klassifizierte Moleküle</i>	37
3.3.6 <i>HLA-DR</i>	38
3.4 VERGLEICH DES PHÄNOTYPS VON LC UND IDEC BEI VERSCHIEDENEN DERMATOSEN	39
3.4.1 <i>Der hochaffine IgE Rezeptor FcεRI</i>	39
3.4.2 <i>Der niedrigaffine IgE Rezeptor CD23</i>	41

3.4.3 Der niedrigaffine IgG Rezeptor CD16.....	43
3.4.4 Der niedrigaffine IgG Rezeptor CD32.....	45
3.4.5 Der hochaffine IgG Rezeptor CD64	46
3.4.6 Das β 1 Integrin CD49d	48
3.4.7 Das β 2 Integrin CD11a	50
3.4.8 Das β 2 Integrin CD11b	51
3.4.9 Das β 2 Integrin CD11c.....	53
3.4.10 Das Molekül CD1b	55
3.4.11 Das Molekül CD36	56
3.4.12 Das Molekül CD45RA.....	58
3.4.13 Das Molekül E-Cadherin	59
3.4.14 HLA-DR	60
3.4.15 Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86	61
3.5 DIAGNOSTISCHE VERFAHREN	63
3.5.1 Diagnose des atopischen Ekzems durch Fc ϵ RI/CD32.....	64
3.5.2 Diagnose der Psoriasis durch CD64/CD11b auf IDEC.....	67
3.5.3 Diagnose des Kontaktekzems durch E-Cadherin/B7-2 auf Langerhans Zellen	69
3.5.4 Diagnose des Kontaktekzems bei Atopikern durch E-Cadherin/CD80 auf IDEC	71
.....	71
3.5.5 Algorithmus zur Diagnosestellung.....	74
3.5.6 Differentialdiagnose von jeweils zwei Dermatosen.....	77
3.5.6.1 Kreuztabelle der Moleküle auf LC, die eine signifikante Unterscheidung	
zweier Diagnosen erlauben (p<0,05)	78
3.5.6.2 Kreuztabelle der Moleküle auf IDEC, die eine signifikante Unterscheidung	
zweier Diagnosen erlauben (p<0,05)	79
4. DISKUSSION.....	80
4.1 IDEC WERDEN KRANKHEITSABHÄNGIG IN DIE EPIDERMIS REKRUTIERT	80
4.2 DIE PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON IDEC.....	82
4.3 DIE PHÄNOTYPISIERUNG VON LC UND IDEC ALS DIAGNOSTIKUM	84
4.4 AUSBLICK	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	89
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
7. ANHANG.....	100
7.1 MEDIEN UND PUFFERLÖSUNGEN	100
7.1.1 Waschmedium (WM).....	100
7.1.2 FACS Puffer (10-fach)	100
7.1.3 Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2-7,4.....	101
7.2 REAGENZIEEN ZUR HERSTELLUNG DER ROHZELLSUSPENSION.....	101
7.3 SEREN UND ANTIKÖRPER ZUR PHÄNOTYPISIERUNG	101
7.3.1 Seren	101
7.3.2 Direkt mit Farbstoff konjugierte Sekundärantikörper	101
7.3.3 Prä-Mix.....	101
8. DANKSAGUNG.....	103
9. LEBENS LAUF	104
10. PUBLIKATIONEN.....	105

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-actinomycin D
AE	Atopisches Ekzem
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zellen
BG	Birbeck Granula
CD	Cluster of differentiation
DC	Dendritische Zellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, ein Fluoreszenzfarbstoff
FI1	Kanal der Grünfluoreszenz in der durchflusszytometrischen Analyse
FI2	Kanal der Orange fluoreszenz in der durchflusszytometrischen Analyse
FI3	Kanal der Rotfluoreszenz in der durchflusszytometrischen Analyse
FSC	Vorwärtsstreuung in der durchflusszytometrischen Analyse
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KAE	Allergisches Kontaktekzem bei Patienten mit atopischer Diathese
KE	Allergisches Kontaktekzem
LR	Lichen ruber
LC	Langerhans Zellen
MF	Mycosis fungoides
mFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
N	Anzahl
n.a.	nicht anwendbar
NH	Normale Haut
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NumE	Nummuläres Ekzem
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin, ein Fluoreszenzfarbstoff
PSO	Psoriasis
rFI	relativer Fluoreszenzindex
SSC	Seitwärtsstreuung in der durchflusszytometrischen Analyse
upm	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 *Das diagnostische Dilemma*

Die klinische Dermatologie ist bis heute im wesentlichen eine Erfahrungswissenschaft. Zwar haben in den letzten Jahren zahlreiche neue Diagnostische Verfahren aus dem Bereich der Labordiagnostik, immunologischen- und allergologischen Diagnostik sowie der bildgebenden Diagnostik auch in der Dermatologie Einzug gehalten. Auf dem Weg zur Diagnose ist aber immer noch die Beurteilung und Zuordnung des Hautbefundes zu einer Krankheitsentität durch einen erfahrenen Dermatologen der entscheidende Schritt. Für die klinische Einstufung einer Dermatose bildet die genaue Charakterisierung der einzelnen Effloreszenzen sowie deren Verteilungsmuster die Basis der klinischen Diagnosefindung. Eine weitere wichtige Rolle bei der Beurteilung einer Dermatose spielt der Verlauf, der durch eine genaue Anamnese beurteilt werden kann. Auf der Basis dieser klinischen Beurteilung konnte in der Dermatologie eine Einteilung der Hauterkrankungen in ein ausgesprochen fein gegliedertes System von über 4000 Einzeldiagnosen erfolgen. Seit der Etablierung dieses vor allem auf Erfahrung beruhenden Diagnosesystems sind zahlreiche neue Anforderungen an die diagnostischen Fähigkeiten des Dermatologen hinzugekommen. Dies beruht einerseits auf der Tatsache, dass Patienten bereits mit weniger stark ausgeprägten Hautbefunden die Hilfe eines Dermatologen suchen sowie auf einer starken Zunahme von ekzematösen Hauterkrankungen durch Umwelteinflüsse und der immer stärkeren Verbreitung von Kontaktallergenen im beruflichen und täglichen Leben. Auf der anderen Seite aber steht die Anforderung an die moderne Dermatologie, rasch - und mit einer hohen Präzision - die richtige Diagnose zu stellen und eine spezifische Therapie einzuleiten.

Den größten labortechnischen Beitrag zur Diagnosefindung liefert die histologische Untersuchung von läsionaler Haut. Aufgrund der einfachen und für den Patienten

schonenden Art, eine Hautprobe für die histologische Untersuchung zu gewinnen, ist die Histologie zu einer tragenden Säule der dermatologischen Diagnosefindung geworden. Leider versagt die Histologie aber häufig in der Differentialdiagnose der entzündlichen Hauterkrankungen. Durch die steigende Prävalenz des atopischen Ekzems, des Kontaktekzems sowie anderer ekzematöser und entzündlicher Hauterkrankungen ergibt sich deshalb in der modernen Dermatologie ein zunehmendes diagnostisches Dilemma. So liefern zum Beispiel im Falle eines atopischen Ekzems die bisherigen labortechnischen Untersuchungen (IgE im Serum, SX1-RAST), allergologische Untersuchungen wie die Pricktestung und der Atopiepatchtest, aber eben auch die histologische Untersuchung nur eine Verdachtsdiagnose. Die eindeutige Diagnosefindung aufgrund einer einzelnen Hautläsion, wie sie für Neoplasien, aber auch für blasenbildende Erkrankungen üblich ist, war bisher bei ekzematösen Hauterkrankungen nicht möglich.

Ein diagnostisches Verfahren, das einen Ausweg aus dieser Situation bieten könnte, wurde erstmals 1995 von Wollenberg und Bieber vorgestellt[55]. Eine ausführliche Beschreibung der zugrundeliegenden Methode erfolgte 1999[56]. Das Verfahren beruht auf der Phänotypisierung immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle auf den dendritischen Zellen der Epidermis. Es nutzt dabei in geschickter Weise die Tatsache aus, dass der messbare Phänotyp dieser beiden Zelltypen, aufgrund ihrer zentralen Rolle für zahlreiche Immunologische Mechanismen in der Haut, zum Abbild des krankheitsspezifischen Mikromilieus in der Epidermis wird.

1.2 Die Rolle der dendritischen Zellen in der Epidermis

Unter den Antigen präsentierenden Zellen stellen die dendritischen Zellen den Dreh- und Angelpunkt eines ausgefeilten körpereigenen Nachrichtensystems dar, indem sie

Informationen über eindringende Pathogene in äußerst effizienter Weise an verschiedene "Effektor Zellen" des Immunsystems, wie zum Beispiel T Zellen, weiterleiten[41].

Den am längsten bekannten dendritischen Zelltyp der Haut stellen die Langerhans Zellen dar. Ihr Name geht auf ihren Entdecker Paul Langerhans (1868) zurück, der sie zunächst für Zellen des Nervensystems hielt. Heute weiß man, dass sie die Vorposten des Immunsystems in der Epidermis sind. Ihr ultrastrukturelles Charakteristikum sind die tennisschlägerförmigen, zytoplasmatischen Langerhanszell-Granula, die auch Birbeck-Granula genannt werden[8].

Neben den klassischen Langerhans Zellen konnte 1996 eine weitere Art dendritischer Zellen in der Epidermis von Wollenberg et al. herausgearbeitet werden. Nach eingehender Charakterisierung wurde für diesen Zelltyp die Bezeichnung „IDEC“ (Inflammatorische dendritische epidermale Zellen) geprägt[53].

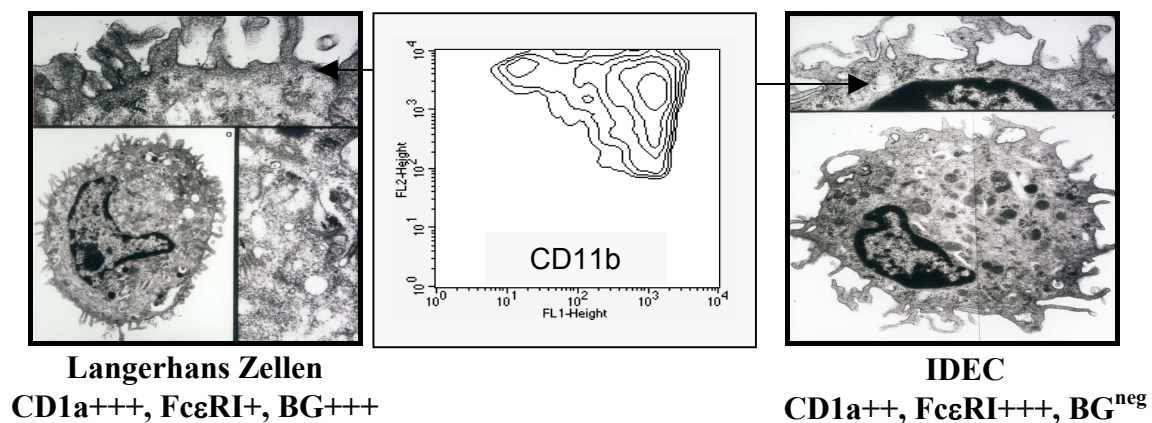


Abbildung 1: Ultrastrukturelle und phänotypische Unterschiede der beiden CD1a-positiven dendritischen Zelltypen in der Epidermis

In der läSIONalen Haut ekzematöser, entzündlicher Hauterkrankungen lassen sich zwei verschiedene Populationen CD1a-positiver dendritischer Zellen nachweisen, die sich sowohl phänotypisch als auch elektronenmikroskopisch unterscheiden. In dem in der Mitte dargestellten Density-Plot erkennt man IDEC an ihrer hohen CD1a⁺⁺, CD11b⁺⁺⁺ Expression. Elektronenmikroskopisch weisen IDEC keine Birbeck-Granula auf. Sie haben einen eher nierenförmigen Zellkern und sehr viele vesikelartige Strukturen. Diese können als Zeichen einer hohen endozytotischen Aktivität gewertet werden. Die LC dagegen sind CD1a⁺⁺⁺, CD11b⁻ und sind elektronenmikroskopisch durch die charakteristischen Birbeck-Granula zu identifizieren.

Eine Begründung für die relativ späte Abgrenzung dieses Zelltyps von den klassischen Langerhans Zellen dürfte in der relativ schwierigen flowzytometrischen Nachweistechnik sowie in der Tatsache, dass IDEC nur in entzündlicher Epidermis vorkommen, liegen.

Von Langerhans Zellen ist bekannt, dass sie knapp 2% der gesamten Zellpopulation der Epidermis ausmachen und ursprünglich aus dem Knochenmark stammen[10]. In vitro Versuche legen nahe, dass sie von CD34 positiven Vorläuferzellen abstammen, in die Epidermis einwandern und dort ihre Funktion als unreife dendritische Zellen wahrnehmen[4]. Es obliegt ihnen dabei die Aufgabe der Antigenaufnahme und Antigenprozessierung. Mit Hilfe von verschiedenen Rezeptoren, wie dem hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI)[6] oder Fcγ-Rezeptoren für Immunglobuline vom IgG-Typ, gelingt es ihnen, spezifische Antigene zu internalisieren. Anschließend verlassen die Langerhans Zellen den Epithelverband in Richtung der regionären Lymphknoten. Sie erfahren dabei eine tiefgreifende phänotypische und funktionelle Veränderung, die sie zu potenten stimulatorischen Zellen werden lässt. Moleküle zur Antigenaufnahme werden dabei auf der Zelloberfläche herunterreguliert, und statt dessen werden kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sowie die zur Antigenpräsentation erforderlichen Moleküle des MHC II Komplexes exprimiert. In den parakortikalen Bereichen des Lymphknotens treffen die Langerhans Zellen auf die T-Zellen, denen sie über MHC I und MHC II gebundene Peptide präsentieren. In Folge wandern die stimulierten T-Zellen in die Haut und bilden dort das zelluläre Substrat typischer Entzündungsreaktionen, wie sie beim Kontaktekzem oder dem atopischen Ekzem zu beobachten sind.

Über die Funktion der IDEC ist bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, dass Monozyten in entzündlich veränderte Haut einwandern und dort durch das vorliegende Mikromilieu zu IDEC ausreifen. Da IDEC einerseits aufgrund ihrer Morphologie, andererseits aufgrund der Expression typischer Oberflächenmoleküle, wie CD1a, HLA-DR und FcεRI, eindeutig den dendritischen Zellen zugeordnet werden können, wird vermutet, dass ihnen

ebenfalls eine Aufgabe bei der Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation zukommt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IDEC die wesentliche epidermale dendritische Zellpopulation sind, die auf ihrer Zelloberfläche bereits in situ die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 tragen[48].

1.3 Die Rolle der verschiedenen Oberflächenmoleküle

1.3.1 Fc ϵ RI auf dendritischen Zellen

Sowohl Monozyten als auch LC und DC tragen den hochaffinen IgE Rezeptor Fc ϵ RI, der sich aber von dem Rezeptor auf den Effektor Zellen der anaphylaktischen Reaktion, den Mastzellen und Basophilen deutlich unterscheidet[29; 42]. Während Fc ϵ RI auf Mastzellen und Basophilen eine tetramerische Struktur aus einer α -Kette, einer β -Kette sowie 2 γ -Ketten aufweist, besteht Fc ϵ RI auf humanen antigenpräsentierenden Zellen aus einer α -Kette sowie zwei γ -Ketten. Die höchste Oberflächenexpression dieses Rezeptors findet sich auf IDEC in läsionaler Haut des atopischen Ekzems[56]. Eine niedrige oder fehlende Expression des Rezeptor-Komplexes auf der Zelloberfläche ist bedingt durch eine niedrige Produktion der für die Signaltransduktion wesentlichen γ -Kette[33]. Eine wesentliche Funktion von Fc ϵ RI auf epidermalen dendritischen Zellen liegt in der rezeptorvermittelten Endozytose von multimerischen Liganden. Die so aufgenommenen Antigene werden in MHCII Kompartimente aufgenommen, in denen sie durch eine Cathepsin abhängige Prozessierung für die Beladung der neu synthetisierten MHCII-Moleküle vorbereitet werden[37].

1.3.2 Fc ϵ RII/CD23

Der niedrigaffine IgE Rezeptor (Fc ϵ RII oder CD23) findet sich in sehr variabler Ausprägung auf einer Vielzahl von Zellen, einschließlich eosinophiler Granulozyten,

Lymphozyten, Monozyten und dendritischer Zellen. Der Nachweis, dass CD23 auf der Oberfläche von epidermalen Langerhans-Zellen exprimiert wird, wurde erstmals 1991 von Bieber et al. sowie Torresani et al. erbracht[5; 50]. CD23 besteht aus einer Kette mit drei repetitiven Sequenzen von je 21 Aminosäuren. Das Molekül existiert entweder in seiner membrangebundenen Form oder kann durch Autoproteolyse in seine lösliche Form sCD23 übergehen[9]. In Bezug auf die dendritischen Zellen der Epidermis konnte von Wollenberg et al.[52] gezeigt werden, dass sich sCD23 vor allem auf der Zelloberfläche von IDEC passiv an CD11b und CD11c anlagert. Besonders viel sCD23 wird auf IDEC bei Patienten mit Psoriasis gebunden. Die membranständige Form von CD23 wird weder von IDEC noch von Langerhans Zellen exprimiert.

1.3.3 β 1 Integrine

Die Moleküle VLA-1 bis VLA-6 gehören zur Gruppe der β 1 Integrine. Sie bestehen aus einer regulatorischen α -Untereinheit und einer β -Untereinheit, die für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Aktivierung findet über extrazelluläre Matrixproteine statt. β 1 Integrine zählen zu der Familie der Zelloberflächenmoleküle, welche die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixproteine bewirken. Im intrazellulären Teil sind die kurzen zytoplasmatischen Domänen der Integrine assoziiert mit Proteinen wie Talin und α -Actinin. Zusammen ermöglichen die Integrine die Regulation nicht nur der Zelladhäsion, sondern auch der Zellmigration und von Veränderungen der Zelloberflächen. Zusätzlich haben sie eine Funktion in der Signaltransduktion und Genregulation[3; 11].

1.3.4 β 2 Integrine

CD11a, CD11b und CD11c bilden die jeweiligen α -Ketten von drei β 2 Integrinen. Sie werden auf der Zelloberfläche als nicht verknüpftes Heterodimer mit einer konstanten β -Kette (CD18) gefunden. Während CD11a hauptsächlich von Lymphozyten,

Granulozyten und Monozyten exprimiert wird, findet sich CD11b vor allem auf NK-Zellen, ist aber genauso wie CD11c auch auf myeloischen Zellen nachzuweisen.

Die Expression von CD11b und CD11c unterliegt dem Einfluss entzündlicher Mediatoren. Die funktionelle Bedeutung von CD11/CD18 liegt in der Vermittlung von interzellulärer Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion. CD11b/CD18 kann zusätzlich die Interaktion mit Matrixproteinen vermitteln sowie mit Komponenten des Komplementsystems und mit ICAM-1 interagieren. Die Aufgabe von CD11c/CD18 liegt hauptsächlich in der Bindung von Fibrinogen.

1.3.5 Fc γ -Rezeptoren

Zur Familie der IgG bindenden Rezeptoren zählen der hochaffine IgG Rezeptor CD64 sowie die beiden niedrigaffinen IgG Rezeptoren CD32 und CD16. Während CD64 vor allem auf Monozyten und Makrophagen zu finden ist, wird CD32 auf Monozyten, Makrophagen, neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, B-Lymphozyten und Thrombozyten sowie auf Langerhans-Zellen und IDEC exprimiert. CD16 kann auf Makrophagen, NK-Zellen sowie Subpopulationen von Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden.

Obwohl die Fc γ -Rezeptoren bei den verschiedenen Zellarten die gleichen Liganden besitzen, vermitteln sie jedoch je nach Zelltyp unterschiedliche Reaktionen. Auf Langerhans Zellen sollen sie eine immunmodulatorische Funktion einnehmen[16; 47].

1.3.6 Cadherine

Cadherine sind Adhäsionsmoleküle, die für eine stabile Interaktion zwischen einer Zelle und dem Gewebe verantwortlich sind. Fast alle Formen haben 5 homologe extrazelluläre Domänen, ein die Membran durchspannendes Segment und eine zytoplasmatische Domäne, die durch Catenine mit den zytoskelettalen Mikrofilamenten verbunden ist. E-

Cadherin ist sowohl auf Langerhans Zellen als auch auf Keratinozyten exprimiert und ist wesentlich für den Zellkontakt zwischen diesen beiden epidermalen Zelltypen[25].

1.3.7 MHC-Klasse II

MHC-Klasse II Moleküle können unterteilt werden in HLA-DR,-DQ und -DP. Beim gesunden Menschen sind Langerhans Zellen die einzigen kutanen Zellen, die das HLA-DR Antigen tragen. Über die HLA-Moleküle werden exogene Antigene den CD4⁺ Lymphozyten präsentiert[34; 38].

1.3.8 CD36

CD36 ist auf der Zelloberfläche von Thrombozyten, Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen zu finden. CD36 hat eine Funktion bei der Zelladhäsion und fungiert auch als Rezeptor für Thrombospondin[21] und Kollagen. Auch auf der Oberfläche von Langerhans Zellen und IDEC kann CD36 exprimiert werden.

1.3.9 CD45

CD45 wird auch „Leukocyte common antigen“ genannt und kann mit Ausnahme von Erythrozyten auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs gefunden werden, so auch auf Langerhans Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben.

Über CD45 Moleküle werden zelluläre Phosphorylierungsgrade verschiedener Strukturen reguliert, die in die Signaltransduktion und Zellaktivierung involviert sind. CD45 scheint funktionellen Einfluss auf die FcεRI mediierte Aktivierung von LC in atopischer Haut zu haben[7].

Humane Langerhans Zellen aus normaler Haut exprimieren CD45RO, aber nicht CD45RA oder CD45RB. Während der in vitro Kultur und Ausreifung nimmt die CD45RB Expression zu, während CD45RO abnimmt. Langerhans Zellen in läsionaler Haut des atopischen Ekzems exprimieren CD45RO und CD45RB. Kreuzvernetzung von

CD45 auf Langerhans Zellen atopischer Spender inhibiert die intrazelluläre Calciummobilisierung als Antwort auf eine Aktivierung der Zellen über FcεRI[7].

1.3.10 CD1

Das Thymozyten-Differenzierungsantigen CD1 existiert mit fünf codierenden Genloci (CD1a, CD1b, CD1c und CD1d sowie 4 Subtypen), die jedoch unterschiedliche Gewebsverteilungen aufweisen. Strukturell ähnelt CD1 dem MHC-I-Komplex und wird in Verbindung mit β2-Mikroglobulinen exprimiert[36; 39].

Mittlerweile ist bekannt, dass bestimmte T-Zell Typen direkt mit CD1 exprimierenden Zellen reagieren können. Dabei handelt es sich um eine antigenunabhängige Interaktion[1; 19; 44]. Vor kurzem wurde ein zweiter Mechanismus der CD1–T-Zell-Interaktion beschrieben. Hierbei werden mikrobielle Antigene über CD1 präsentiert. Die Erkennung durch T-Zellen ist dann CD1 restringiert, aber unabhängig von MHC I und MHC II[1; 2; 45]. Bei den präsentierten Antigenen handelt es sich vor allem um mykobakterielle Antigene. Für CD1b konnte nachgewiesen werden, dass auch nicht-proteinhaltige Antigene, vorwiegend aus Lipiden bestehend, den T-Zellen über CD1 präsentiert werden[2].

In der Epidermis gilt CD1a heute als zuverlässiger Marker für epidermale dendritische Zellen (LC und IDEC)[22]. CD1b wird in der Epidermis vor allem von IDEC bei Entzündungsreaktionen exprimiert. CD1c wird ebenfalls von LC exprimiert[17]. Neben den Zellen des Intestinaltrakts exprimieren auch dermale dendritische Zellen CD1d[23].

1.4 Fragestellung

Die dendritischen Zellen der Epidermis bilden die vorderste Front eines immunologischen Erkennungsnetzwerkes. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen in der Epidermis und Dermis freigesetzt. Das resultierende Mikromilieu prägt den Phänotyp und die Funktion von Langerhans Zellen und führt darüber hinaus zur Rekrutierung von IDEC, deren Phänotyp ebenfalls durch das entzündliche Mikromilieu geprägt wird.

In dieser Arbeit wurde der Phänotyp von Langerhans Zellen und IDEC in normaler und entzündlich veränderter Epidermis untersucht. Zur Beurteilung des Phänotyps wurden die unter 1.3 vorgestellten Moleküle herangezogen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie setzt sich der epidermale Zellpool der dendritischen Zellen (LC und IDEC) bei verschiedenen Diagnosen quantitativ zusammen?
2. Inwieweit unterscheidet sich der Phänotyp von LC und IDEC im Vergleich von normaler und entzündlich veränderter Epidermis?
3. Lassen sich, neben dem atopischen Ekzem, auch weitere entzündliche Hauterkrankungen durch ein charakteristisches Expressionsprofil von Oberflächenmarkern auf LC und IDEC diagnostizieren?
4. Lassen sich diagnostische Algorithmen formulieren, die als Grundlage für eine standardisierte Diagnosestellung mittels Phänotypisierung dienen können?

2 Material und Methodik

2.1 Auswahl der Patienten

Die Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen wurde bei 296 Patienten der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig), die sich im Zeitraum von November 1993 bis Juni 1996 in ambulanter oder stationärer Behandlung befanden, durchgeführt. Das Einverständnis aller Patienten für die Entnahme der Hautproben zu wissenschaftlichen Zwecken wurde eingeholt. Ein entsprechendes Votum wurde von der zuständigen Ethikkommission vor Beginn eingeholt. Es wurden ausschließlich Patienten herangezogen, die vor Entnahme der Hautprobe für mindestens zwei Wochen weder topisch noch systemisch mit Steroiden behandelt worden waren. Die Hautproben wurden in Stanz- oder Shave-Technik entnommen. Von allen Patienten wurden nach Abschluss der jeweiligen Behandlung sämtliche Untersuchungsbefunde, Laborergebnisse, allergologische Untersuchungen ausgewertet und eine definitive Diagnose bestimmt. Von den 296 Patienten wurden insgesamt 104 retrospektiv von der statistischen Auswertung der Phänotypisierung ausgeschlossen. Gründe hierfür waren entweder, dass trotz Berücksichtigung aller Befunde keine eindeutige Diagnose abschließend gestellt werden konnte oder dass bei der Aufarbeitung der Hautproben technische Fehler unterlaufen waren. Die Diagnosen der verbliebenen 192 Patienten verteilten sich wie folgt:

<u>Erkrankung</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Anzahl</u>
Normale Haut	NH	31
Atopisches Ekzem	AE	59
Psoriasis	PSO	41
Allergisches Kontaktekzem	KE	23
KE bei atopischer Diathese	KAE	14
Lichen ruber	LR	6
Mycosis fungoides	MF	10
Nummuläres Ekzem	NumE	8

Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei wurden alle untersuchten Diagnosen auf signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten Moleküle verglichen.

2.2 Herstellung der epidermalen Zellsuspension

Die Präparation der epidermalen Zellsuspension und die durchflusszytometrische Analyse der CD1a positiven epidermalen Zellen folgte einem publizierten Protokoll der Arbeitsgruppe[56]. Die Biopsien wurden sofort nach ihrer Entnahme mehrmals in sterilem PBS gewaschen, mit einem Skalpell in schmale Streifen geschnitten und mit der Epidermis nach oben in einer Petrischale ausgebreitet. Anschließend wurde die Dermis sorgfältig von der Epidermis mechanisch entfernt und die so bearbeitete Biopsie mit der epidermalen Seite nach oben für 24h in Trypsinlösung bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die durch das Trypsin abgespaltene Epidermis mit einer Pinzette abgezogen und in 20ml Waschmedium mit 2ml DNase-Lösung gelegt und nach 5

Minuten im Brutschrank mit einem Vortex-Gerät 60 Sekunden geschüttelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend durch ein steriles Nylonnetz mehrfach filtriert.

2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Es handelt sich im Prinzip um eine indirekte Dreifarbenfluoreszenzfärbung vitaler epidermaler Langerhans Zellen und IDEC. Je $2-5 \times 10^5$ epidermale Rohzellen wurden 2 mal in FACS-Puffer bei 4°C und 1000upm gewaschen. Die Inkubation mit monoklonalen unkonjugierten Primärantikörpern oder irrelevanten Kontrollen des gleichen Isotyps erfolgte in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml für 30min bei 4°C. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Inkubation (30min) mit einem FITC-konjugierten polyklonalen F(ab')₂ Ziege anti-Maus Antikörper in einer Endkonzentration von 7 µg/ml. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das Fc-Fragment von murinem IgG.

Durch einmaliges Waschen mit FACS-Puffer wurde der überschüssige Antikörper entfernt und die Zellsuspension für 15 Minuten mit normalem Mausserum (Endverdünnung 1:30) inkubiert, um die freien Bindungsstellen des gegen Mausproteine gerichteten Sekundärantikörpers abzublocken und dadurch die spezifische Bindung des folgenden Antikörpers zu ermöglichen. Schließlich wurde, nach einem weiteren Waschschrift, das membranständige CD1a-Molekül durch den mit Phykoerythrin (PE) konjugierten monoklonalen Antikörper T6RD1 detektiert (Endverdünnung 1:300). Dieser 30-minütige Schritt wurde mit der Vitalfärbung mit dem DNA-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7AAD) in einer Endkonzentration von 1µg/ml kombiniert. Nach dem letzten Waschvorgang in FACS-Puffer wurden die Zellen am Durchflusszytometer eingemessen.

2.4 Monoklonale Antikörper

Name	Clone	Isotyp	Firma
CD11a	25.3.1	IgG κ	Immunotech
CD11b	BEAR 1	IgG κ	Immunotech
CD11c	BU15	IgG1	Immunotech
CD16	3G8	IgG1	Immunotech
CD32	2E1	IgG2a	Immunotech
CD64	10.1	IgG1 κ	Immunotech
CD80	MAB104	IgG1	Immunotech
CD86	IT2.2	IgG2b	Pharmingen
Fc ϵ RI	22.E7	IgG1	Hoffman-La Roche
CD23	9P.25	IgG1	Immunotech
CD1b	4.A7.6	IgG2a	Immunotech
CD36	F.A6-152	IgG1	Immunotech
CD45	ROS 220	IgG1	Immunotech
CD49a	HP2B6	IgG1	Immunotech
CD49b	Gi9	IgG κ	Immunotech
CD49c	C3II.1	IgG1	Immunotech
CD49d	9F10	IgG1	Immunotech
CD49e	IIA1	IgG1	Immunotech
CD54	84H10	IgG1	Immunotech
E-Cadherin	E7A4	IgG1	Immunotech
HLA-DR	G46-6	IgG2a	Pharmingen

Alle Antikörper wurden zunächst auf 50µg/ml verdünnt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden dann zu 100µl Zellsuspension je 5µl des jeweiligen verdünnten Antikörpers zugesetzt, so dass eine Arbeitskonzentration von 2,5 µg/ml erreicht wurde.

2.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die gefärbte Zellsuspension wurde an einem FACScan Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson eingemessen, wobei zur Auswertung der Daten die Lysis II-Software der Firma Becton Dickinson verwendet wurde. Für die Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung von Zellsuspensionen mit einem hohen Gehalt an toten Zellen wurden die vitalen epidermalen dendritischen Zellen durch eine Kombination von Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht (FSC/SCC) und den CD1aPE/7AAD (F12/F13) Parametern durch Setzen sogenannter „Gates“ eingegrenzt.

Für die weitere Analyse wurde die mediane Fluoreszenzintensität (mFI) der durch Gates eingegrenzten Zellpopulation ermittelt und dann aus den entsprechenden Werten des für das nachzuweisende Molekül spezifischen Antikörpers und eines irrelevanten Kontrollantikörpers der relative Fluoreszenzindex (rFI) errechnet:

$$rFI = \frac{mFI(\text{spezifische Färbung}) - mFI(\text{Kontrolle})}{mFI(\text{Kontrolle})}$$

Der rFI bietet gegenüber der klassischen prozentualen Angabe des Anteils positiver Zellen den Vorteil, dass er auch für stark exprimierte Moleküle ein empfindliches Maß für die Schwankungen der Expression bildet. Die prozentuale Angabe positiver Zellen kann jenseits von 100% keine sinnvollen Werte liefern. Der rFI entspricht darüber hinaus der Vorstellung, dass es bei den durchgeführten Untersuchungen um eine Quantifizierung der Oberflächenexpression o.g. Moleküle auf einem durch andere Fluoreszenzfärbungen klar abgegrenzten Zelltyp ging und nicht um die Bestimmung des prozentualen Anteils verschiedener Zelltypen. Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der jeweiligen

rFI's liegt bei einem rFI von 1. Werte von rFI<1 müssen als Hintergrundfluoreszenz angesehen werden.

2.6 Testung der Trypsinsensitivität

Alle von uns untersuchten Moleküle waren, bevor sie regelhaft im Rahmen der Phänotypisierung gefärbt wurden, auf ihre Sensitivität gegenüber der von uns verwandten limitierten Trypsinierung untersucht worden. Hierbei wurde zunächst die Expressionsstärke des jeweiligen Moleküls auf PBMCs flowzytometrisch bestimmt. Anschließend wurden diese Zellen für 24h bei 4°C in Trypsinlösung inkubiert und danach erneut eine flowzytometrische Bestimmung der Expressionsstärke des jeweiligen Moleküls durchgeführt. Moleküle, die eine deutliche Abnahme der Oberflächenexpression bedingt durch die Trypsinierung zeigten, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

2.7 Reagenzien

Die Rezepturen für die verwandten Reagenzien, Medien, Wasch- und Pufferlösungen befinden sich im Anhang.

2.8 Statistische Methoden

Im Rahmen der deskriptiven Statistik der Ergebnisse wurden die folgenden statistischen Maße verwandt (nach Harms, Biomathematik – Statistik und Dokumentation, 5. Auflage):

Das arithmetische Mittel: Die Summe geteilt durch die Anzahl der Fälle.

Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM):

$SEM = \text{Standardabweichung der Messungen} / \sqrt{\text{Anzahl der Messungen}}$

Sensitivität: Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird.

Spezifität: Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Gesunder als gesund erkannt wird.

Vorhersagewert: Die Wahrscheinlichkeit, dass die getroffene Diagnose zutreffend ist.

Sensitivität, Spezifität und der Vorhersagewert wurden entsprechend der folgenden Vierfeldertafel berechnet:

Ermittelte Diagnose	Diagnose	k r a n k	g e s u n d
	P s o r i a s i s	A (Richtig)	B (Fehler 1. Art)
	K e i n e P s o r i a s i s	C (Fehler 2. Art)	D (Richtig)
		S e n s i t i v i t ä t: (100% * A)/(A + C)	S p e z i f i t ä t: (100% * D)/(B + D)

Vorhersagewert (krank): $A/(A+B)$

Wie hoch die Spezifität und Sensitivität eines diagnostischen Verfahrens ist, hängt von der „Güte“ des Untersuchungsverfahrens ab.

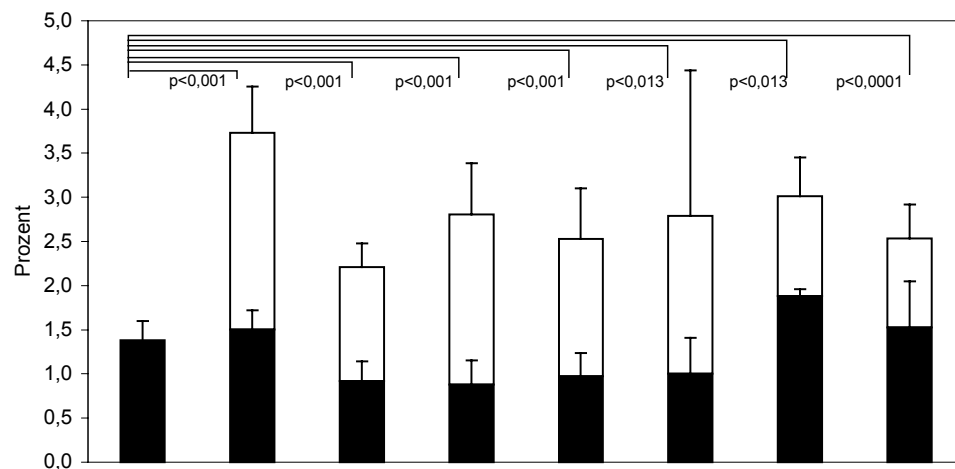
Als statistisches Testverfahren, mit dessen Hilfe beurteilt werden kann, ob sich zwei unverbundene Stichproben bezüglich des jeweiligen Messparameters voneinander statistisch signifikant unterscheiden, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser Test setzt keine Kenntnis über die Verteilung (z.B. Normalverteilung) der Daten voraus.

3 Ergebnisse

3.1 Anteil CD1a positiver Zellen bei verschiedenen entzündlichen Dermatosen

Zunächst untersuchten wir, ob der prozentuale Anteil von Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen entzündlichen Dermatosen Unterschiede aufwies. Es zeigte sich, dass bei allen von uns untersuchten Diagnosen die Zunahme der CD1a positiven epidermalen Zellen durch die Einwanderung von IDEC in die Epidermis verursacht war. Die Gesamtzahl CD1a positiver Zellen war bei allen entzündlichen Dermatosen gegenüber normaler Haut aufgrund dieser Einwanderung signifikant erhöht.

Einwanderung von IDEC in läsionale Haut bei verschiedenen Dermatosen



Diagnose	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	NumE
Prozent LC	1,38 ±0,21	1,50 ±0,22	0,92 ±0,23	0,88 ±0,28	0,98 ±0,26	1,00 ±0,40	1,88 ±0,08	1,53 ±0,52
Prozent IDEC	0,00 ±0,00	2,23 ±0,52	1,30 ±0,27	1,93 ±0,58	1,55 ±0,57	1,79 ±1,65	1,13 ±0,44	1,01 ±0,38
Anzahl N	15	29	20	9	9	2	2	5

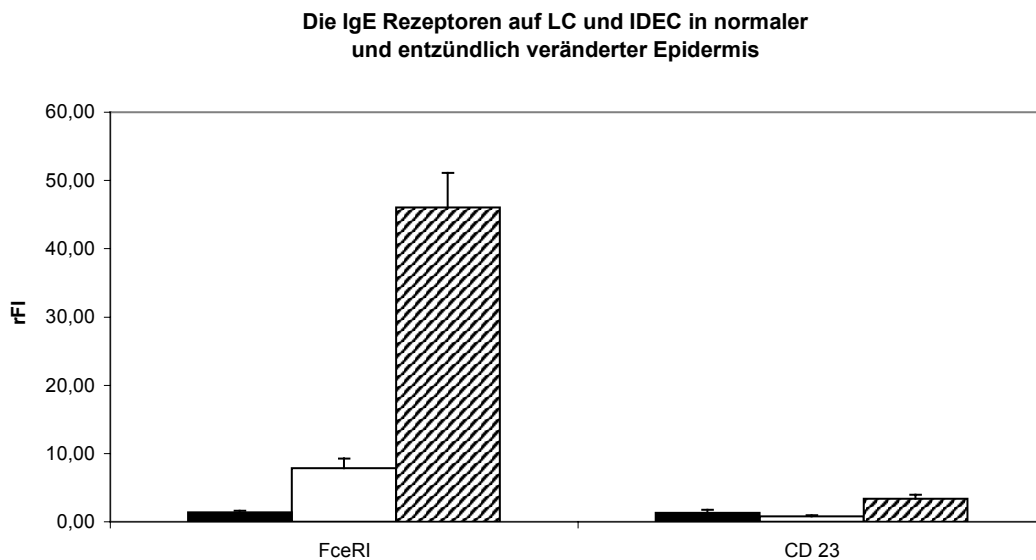
Abbildung 2: Der Anteil CD1a+ dendritischer Zellen in der Epidermis nimmt bei entzündlichen Hauterkrankungen zu

Dargestellt ist der Anteil von LC (schwarzer Balkenteil) und IDEC (weißer Balkenteil) bei normaler Haut (NH), atopischem Ekzem (AE), Psoriasis (Pso), Kontaktekzem (KE), KE bei Pat. mit atopischer Diathese (KAE), Lichen ruber (LR), Mykosis fungoides (MF) und nummulärem Ekzem (NumE). Der prozentuale Anteil, bezogen auf alle epidermalen Zellen, ist auf der y-Achse dargestellt. Die Zunahme der CD1a positiven Zellen bei der jeweiligen Dermatoase, im Vergleich zur normalen Haut, ist mit $p < 0.001$ hoch signifikant. (Mann-Whitney-U-Test).

3.2 Phänotypisierung des CD1a positiven Zellpools in normaler und in entzündlicher Epidermis

3.2.1 Die IgE Rezeptoren FcεRI und CD23

In nicht entzündlicher Haut ist FcεRI und CD23 auf Langerhans Zellen nur sehr schwach exprimiert. Langerhans Zellen aus entzündlicher Haut zeigten hingegen eine erhöhte Expression von FcεRI.



	FcεRI	CD23
Normale Haut LC	1,40 ± 0,25 (n=31)	1,30 ± 0,45 (n=20)
Entzündung LC	7,89 ± 1,37 (n=141)	0,78 ± 0,16 (n=115)
Entzündung IDEC	46,03 ± 5,09 (n=156)	3,38 ± 0,59 (n=128)

Abbildung 3: In normaler und entzündlicher Haut weisen LC und IDEC ein unterschiedliches Oberflächenexpressionsprofil der IgE-Rezeptoren auf.

Dargestellt ist die Expression der hoch- und niedrigaffinen IgE Rezeptoren FcεRI und CD23 auf LC in normaler Haut (schwarze Balken) sowie in entzündlicher Haut auf LC (weiße Balken) und IDEC (gestreifte Balken). Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

IDEC wandern in die Epidermis nur bei Entzündung ein. Betrachtet man alle entzündlichen Hautproben gemeinsam, so war FcεRI auf IDEC mit einem rFI von $46,03 \pm 5,09$ (SEM) um das sechsfache stärker exprimiert als auf Langerhans Zellen. Bezüglich der Stärke der FcεRI Expression stellen IDEC somit den wesentlichen FcεRI tragenden epidermalen Zelltyp dar.

Für den niedrigaffinen IgE Rezeptor CD23 ergab sich, dass dessen passive Anlagerung an LC in normaler Haut nicht stattfindet. Demgegenüber war die Anlagerung von CD23 an IDEC aus entzündlicher Epidermis mit einem rFI von 3,38 eindeutig nachweisbar.

3.2.2 Die IgG Rezeptoren CD16, CD32 und CD64

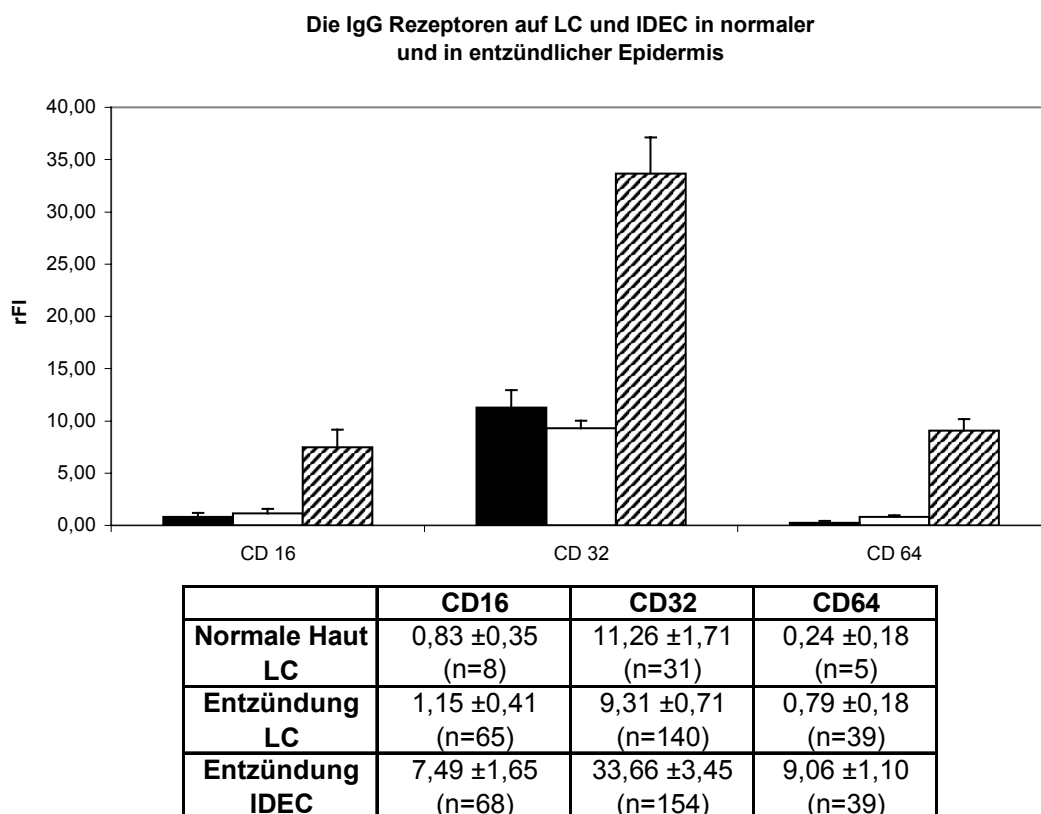


Abbildung 4: IDEC und LC unterscheiden sich durch die Expression der IgG-Rezeptoren

Dargestellt ist die Expression der IgG Rezeptoren (CD16, CD32 und CD64) auf LC in normaler Haut (schwarze Balken) und in entzündlicher Haut auf LC (weiße Balken) und IDEC (gestreifte Balken). Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

In normaler und in entzündlich veränderter Haut konnte keine wesentliche Oberflächenexpression von CD16 und CD64 auf Langerhans Zellen gemessen werden. Deutlich hingegen waren diese IgG Rezeptoren auf IDEC exprimiert (Abbildung 4). Für CD32 ergab sich, dass unabhängig von einer Entzündung eine starke Expression auf Langerhans Zellen bestand. IDEC zeigten allerdings auch bezüglich dieses Rezeptors eine noch höhere Oberflächenexpression. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle IgG-Rezeptoren von IDEC deutlich stärker als von Langerhans Zellen exprimiert werden.

3.2.3 Die β 1 Integrine CD49b und CD49d

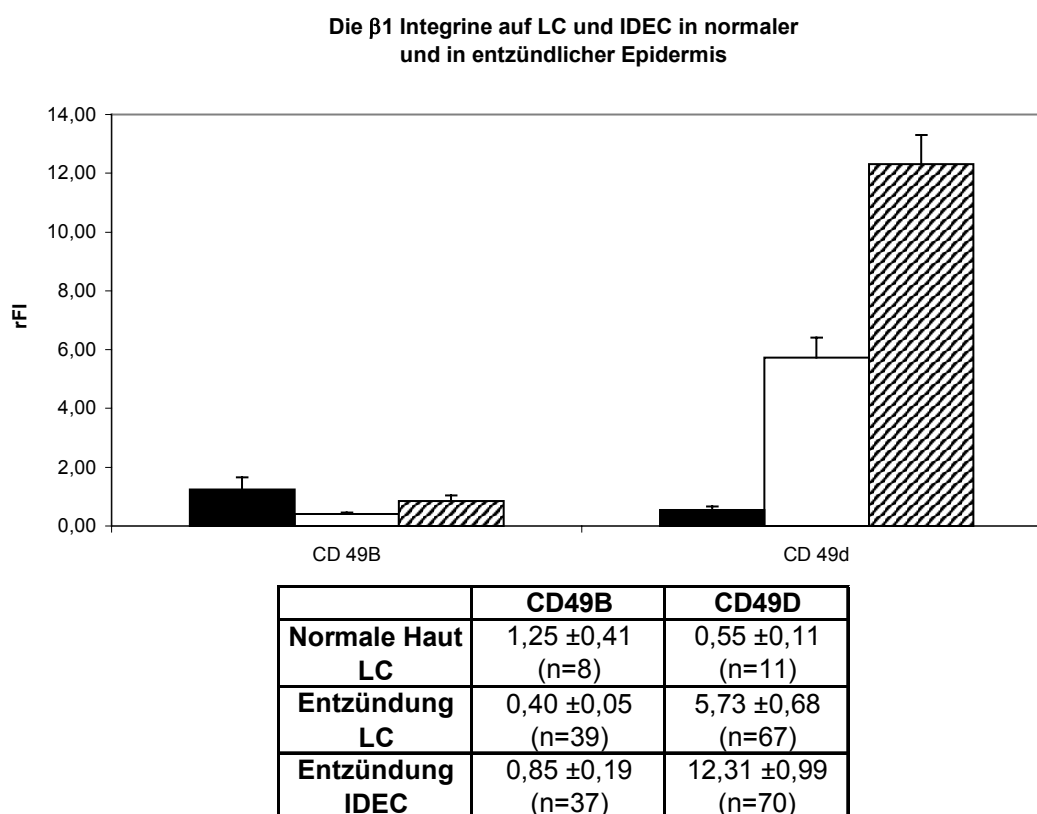


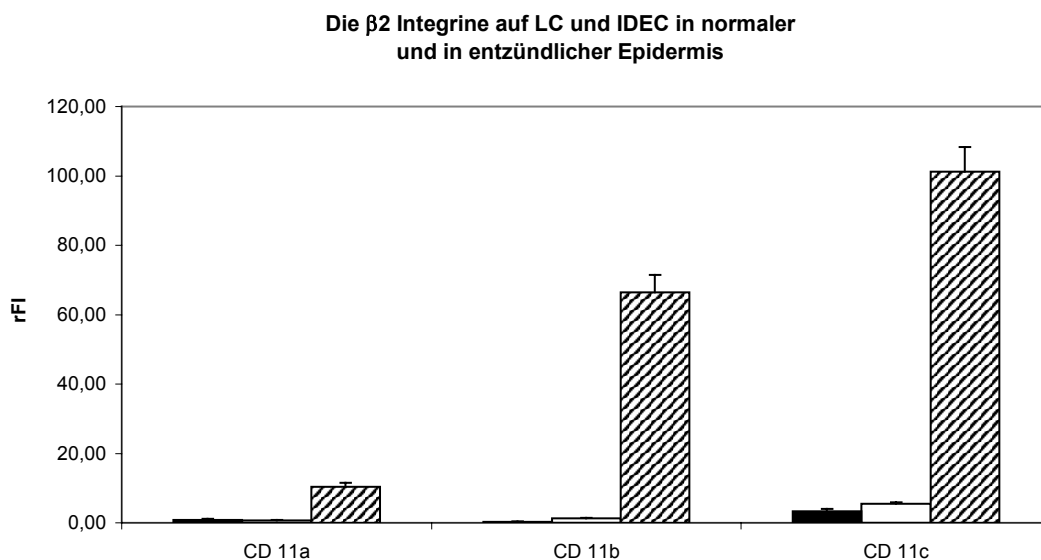
Abbildung 5: Das β 1 Integrin CD49d wird auf LC und IDEC in entzündlicher Haut verstärkt exprimiert

Während die Expression des β 1 Integrins CD49b in normaler und läsionaler Haut sowohl auf LC als auch auf IDEC unterhalb der Nachweisgrenze liegt, weisen LC und IDEC in entzündlichen Hautläsionen eine verstärkte CD49d Expression auf. Die schwarzen Balken stellen die β 1 Integrin Expression in normaler Haut dar, die weißen Balken auf LC in läsionaler Haut und die gestreiften Balken auf IDEC in läsionaler Haut. Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

Als Vertreter der $\beta 1$ Integrine wurde die Oberflächenexpression der jeweiligen α -Kette (CD49b und CD49d) von VLA-2 und VLA-4 untersucht. Eine Expression von CD49b auf Langerhans Zellen und IDEC konnte weder in normaler noch in entzündlicher Epidermis nachgewiesen werden.

Für CD49d wurde in normaler Epidermis ebenfalls keine Expression auf Langerhans Zellen nachgewiesen. Unter dem Einfluss des entzündlichen Mikromilieus hingegen wurde sowohl auf Langerhans Zellen als auch auf IDEC eine deutliche Oberflächenexpression gemessen (Abbildung 5).

3.2.4 Die $\beta 2$ Integrine CD11a, CD11b und CD11c



	CD11A	CD11B	CD11C
Normale Haut LC	0,80 ± 0,29 (n=10)	0,36 ± 0,11 (n=17)	3,39 ± 0,61 (n=10)
Entzündung LC	0,73 ± 0,12 (n=62)	1,34 ± 0,13 (n=84)	5,46 ± 0,47 (n=61)
Entzündung IDEC	10,33 ± 1,28 (n=67)	66,48 ± 4,99 (n=90)	101,27 ± 7,05 (n=66)

Abbildung 6: IDEC in entzündlicher Haut tragen $\beta 2$ Integrine in verstärktem Maß auf ihrer Oberfläche

Dargestellt ist die Expression der $\beta 2$ Integrine CD11a, CD11b und CD11c, die in normaler Haut (schwarze Balken) und auf LC in entzündlichen Läsionen (weiße Balken) niedrig ist. Auf IDEC in läsionaler Haut werden alle untersuchten $\beta 2$ Integrine deutlich exprimiert (gestreifte Balken). Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

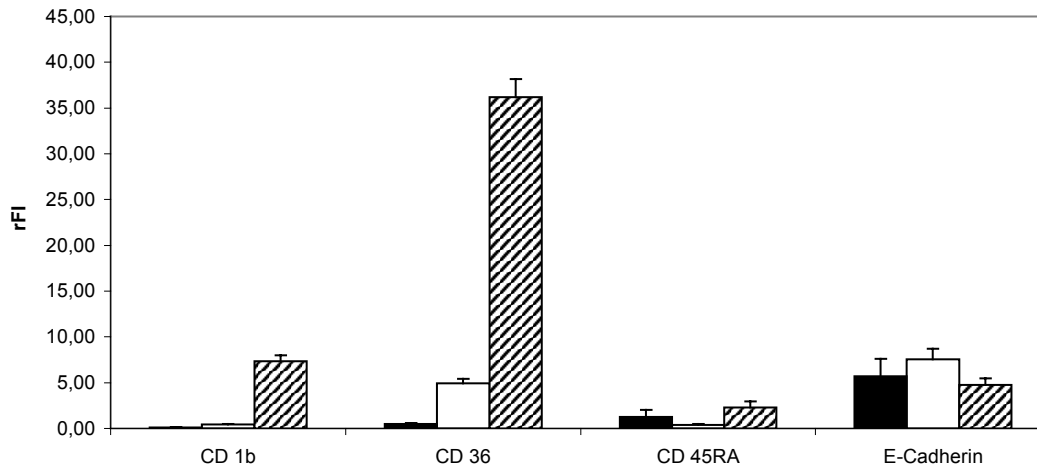
Als Vertreter der zur Gruppe der β 2 Integrine gehörenden Adhäsionsmoleküle wurde die Oberflächenexpression von CD11a, CD11b und CD11c auf Langerhans Zellen und IDEC bestimmt (Abbildung 6). In normaler Haut konnte nur für CD11c eine Oberflächenexpression auf Langerhans Zellen nachgewiesen werden. Unter entzündlichen Bedingungen nahm diese nochmals zu. Für CD11a und CD11b konnte hingegen auch in entzündlicher Epidermis keine Zunahme der Oberflächenexpression auf Langerhans Zellen festgestellt werden. Ein klarer Kontrast zu Langerhans Zellen ergab sich bei den Messungen der Expression von CD11a, CD11b und CD11c auf IDEC. Insbesondere CD11b und CD11c gehörten auf IDEC zu den am stärksten exprimierten Molekülen.

3.2.5 Verschiedene CD-klassifizierte Moleküle

Die Oberflächenexpression einer Reihe weiterer CD-klassifizierter Moleküle wurde bestimmt, um einen Hinweis zu bekommen, welche Moleküle im Rahmen einer Entzündungsreaktion auf CD1a positiven Zellen eine Regulation erfahren (Abbildung 7). Für E-Cadherin konnte gezeigt werden, dass sowohl unter entzündlichen als auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen eine gleich bleibende Expression auf LC und IDEC vorhanden ist.

CD36 ist ein empfindlicher Indikator für das Vorliegen einer epidermalen Entzündung. Vor allem auf IDEC konnten mit einem rFI von 36,18 besonders hohe Expressionsstärken gemessen werden. In die entzündlich veränderte Epidermis eingewanderte IDEC tragen CD1b. Die Entzündungsreaktion hat keinen Einfluss auf die Expressionsstärke von CD45RA auf LC und IDEC.

**Verschiedene Moleküle auf LC und IDEC in normaler
und in entzündlicher Epidermis**



	CD1B	CD36	CD45RA	ECAD
Normale Haut LC	0,14 ±0,05 (n=20)	0,50 ±0,10 (n=23)	1,27 ±0,75 (n=5)	5,69 ±1,89 (n=6)
Entzündung LC	0,46 ±0,04 (n=124)	4,94 ±0,47 (n=126)	0,38 ±0,09 (n=16)	7,56 ±1,16 (n=40)
Entzündung IDEC	7,36 ±0,62 (n=136)	36,18 ±1,99 (n=138)	2,30 ±0,67 (n=17)	4,74 ±0,74 (n=38)

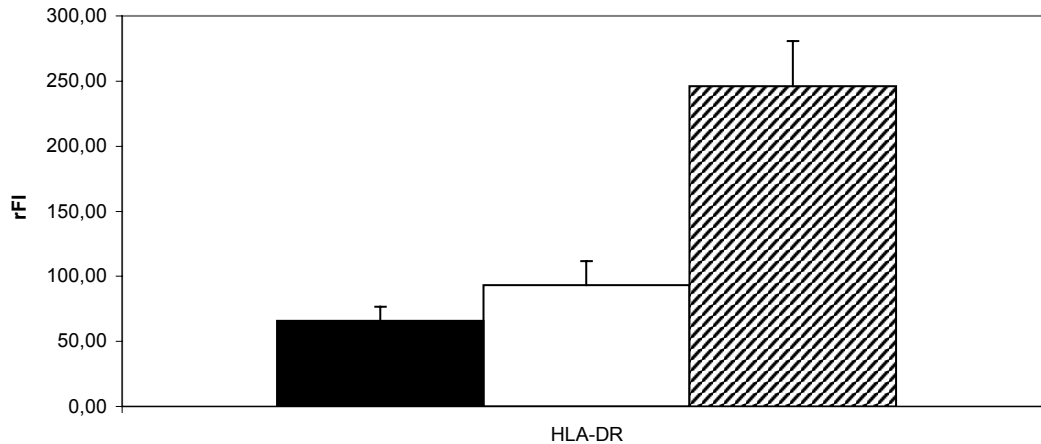
Abbildung 7: In entzündlicher und in nicht-entzündlicher Haut sind LC und IDEC E-Cadherin positiv, aber nur IDEC in läSIONALER Haut sind CD1b positiv

Sowohl in normaler Haut (schwarzer Balken) als auch in entzündlicher Haut tragen LC (weiße Balken) und IDEC (gestreifte Balken) den Marker epithelialer Zellen: E-Cadherin. Beide Zelltypen exprimieren vermehrt CD36 in entzündlicher Haut. Nur IDEC sind CD1b positiv. Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

3.2.6 HLA-DR

Dem MHC II Molekül HLA-DR kommt auf Antigen präsentierenden Zellen eine fundamentale Bedeutung zu. Nur durch die Beladung von MHC II Molekülen mit Antigenen und der anschließenden Präsentation der Antigene können naive T-Zellen stimuliert werden. Entsprechend der Rolle, die HLA-DR für die immunologische Funktion der Antigen präsentierenden Zellen spielt, war es sowohl auf LC als auch auf IDEC das am stärksten exprimierte Oberflächenmolekül. Die hohen Expressionswerte von HLA-DR konnten durch eine epidermale Entzündungsreaktion weiter gesteigert werden.

**HLA-DR auf LC und IDEC in normaler
und in entzündlicher Epidermis**



	HLA-DR
Normale Haut LC	65,82 ± 10,78 (n=6)
Entzündung LC	93,35 ± 18,42 (n=16)
Entzündung IDEC	246,16 ± 34,47 (n=19)

Abbildung 8: Die Expression des MHC II Moleküls HLA-DR ist auf LC und IDEC in entzündlicher Haut verstärkt

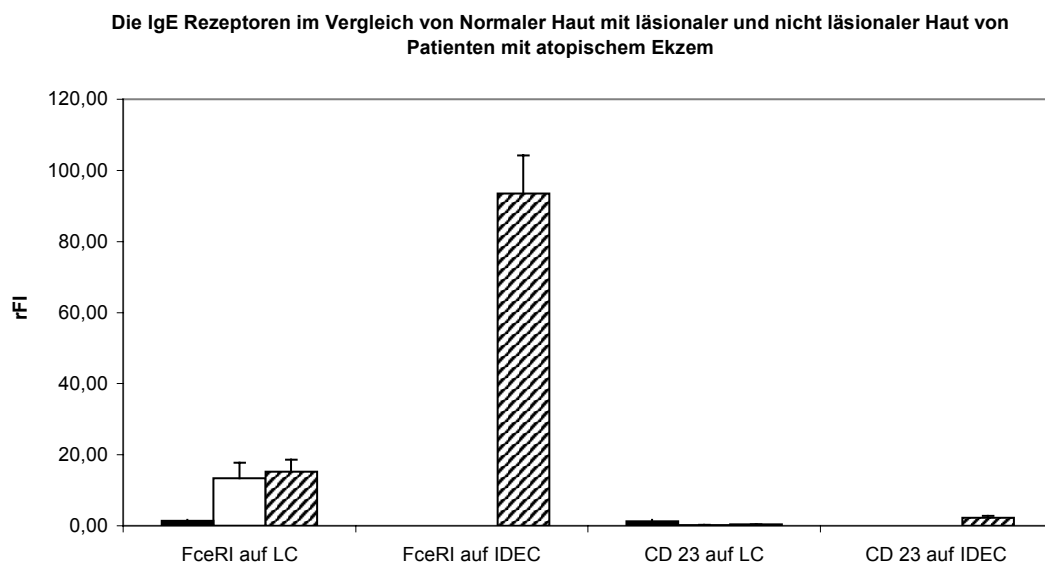
Die Expression von HLA-DR ist auf LC (weiße Balken) und IDEC (gestreifte Balken) in läSIONALER Haut gegenüber normaler Haut (schwarze Balken) verstärkt. Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

3.3 Vergleich läSIONALER und nicht- läSIONALER Haut von Patienten mit atopischem Ekzem mit normaler Haut

Der Phänotyp von LC und IDEC wird durch die epidermale Entzündungsreaktion stark beeinflusst. Für die bisher gezeigten Messungen wurde jeweils normale Haut von Spendern ohne Anzeichen einer Dermatitis als Vergleich herangezogen. Um zu überprüfen, inwieweit bei Patienten mit atopischem Ekzem bereits in nicht-läSIONALER Haut Veränderungen des Phänotyps vorlagen, verglichen wir den Phänotyp von LC von gesunden Spendern mit dem Phänotyp von LC und IDEC in läSIONALER, aber auch mit LC aus nicht-läSIONALER Haut von Patienten mit atopischem Ekzem.

3.3.1 Die IgE Rezeptoren

Dem hochaffinen Rezeptor für IgE wird eine zentrale Rolle für die Antigenaufnahme in dendritische Zellen zugeschrieben. Dies wiederum gehört nach heutigem Verständnis zu den initialen Ereignissen bei der Entstehung eines atopischen Ekzems. Während FcεRI auf Langerhans Zellen aus normaler Haut kaum exprimiert war, zeigte sich, dass bei Patienten mit atopischem Ekzem bereits in nicht-läsionaler Haut die FcεRI Expression stark erhöht war (Abbildung 9).



	FcεRI auf LC	FcεRI auf IDEC	CD 23 auf LC	CD 23 auf IDEC
Normale Haut	1,40 ± 0,25 (n=31)	n.a.	1,30 ± 0,45 (n=20)	n.a.
Normale Haut bei AE	13,40 ± 4,36 (n=7)	n.a.	0,17 ± 0,13 (n=3)	n.a.
Läsion bei AE	15,30 ± 3,30 (n=54)	93,49 ± 10,67 (n=59)	0,36 ± 0,07 (n=43)	2,30 ± 0,52 (n=47)

Abbildung 9: Die höchste Expression des hochaffinen IgE Rezeptors (FcεRI) findet sich auf IDEC in läsionaler Haut beim atopischen Ekzem

Während in normaler Haut gesunder Patienten der hochaffine IgE Rezeptor (FcεRI) und der niedrigaffine IgE Rezeptor CD23/FcεRII nicht oder nur wenig exprimiert werden (schwarze Balken), tragen LC in nicht-läsionaler Haut beim atopischen Ekzem (weiße Balken) FcεRI bereits in verstärktem Maß. Die höchste Expression von FcεRI und FcεRII findet sich auf IDEC in läsionaler Haut von Patienten mit atopischen Ekzem (gestreifte Balken). Auf der y-Achse dargestellt sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers. Da IDEC in normaler Haut nicht vorkommen, war eine Messung der jeweiligen Marker in den mit n.a. gekennzeichneten Bedingungen nicht anwendbar.

Langerhans Zellen aus den entsprechenden Läsionen dieser Patienten zeigten demgegenüber nur noch eine geringgradig höhere Expression.

Der wesentliche Teil sowohl der CD1a- als auch der FcεRI-positiven Zellpopulation wurde in läsionaler Haut durch die IDEC gestellt. Dies galt sowohl für die Höhe der Rezeptorexpression pro Zelle als auch für den prozentualen Anteil der IDEC am CD1a-positiven Zellpool bei atopischem Ekzem. Da IDEC wiederum in nicht-läsionaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem nicht nachgewiesen werden konnten, ist einer der wesentlichen Unterschiede zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut in der Einwanderung von IDEC in die Epidermis zu sehen.

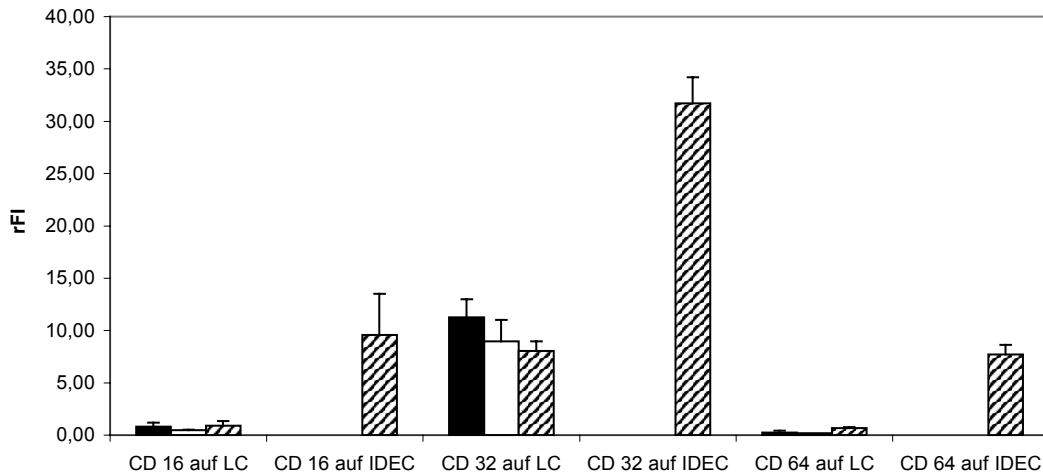
Eine geringgradig erhöhte Expression von CD23 konnte auf IDEC aus läsionaler Haut festgestellt werden. Auf Langerhans Zellen hingegen war die Expression von CD23 in allen drei Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze.

3.3.2 Die IgG Rezeptoren

Unabhängig davon, ob Langerhans Zellen aus normaler Haut, läsionaler oder nicht-läsionaler Haut isoliert wurden, konnte von den drei IgG Rezeptoren nur CD32 nachgewiesen werden. Die Expression von CD32 auf LC war sowohl in läsionaler als auch nicht-läsionaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem gegenüber normaler Haut von gesunden Patienten geringgradig vermindert.

Für IDEC aus läsionaler Haut ergab sich, dass alle drei IgG Rezeptoren stark exprimiert waren. Insbesondere für CD32 ergab sich hierbei eine gegenüber Langerhans Zellen dreifach höhere Rezeptorexpression.

Die IgG Rezeptoren im Vergleich von Normaler Haut mit läSIONALER und nicht läSIONALER Haut von Patienten mit atopischem Ekzem



	CD 16 auf LC	CD 16 auf IDEC	CD 32 auf LC	CD 32 auf IDEC	CD 64 auf LC	CD 64 auf IDEC
Normale Haut	0,83 ± 0,35 (n=8)	n.a.	11,26 ± 1,71 (n=31)	n.a.	0,24 ± 0,18 (n=5)	n.a.
Normale Haut bei AE	0,48 ± 0,06 (n=2)	n.a.	8,96 ± 2,08 (n=7)	n.a.	0,21 ± 0,00 (n=1)	n.a.
Läsion bei AE	0,93 ± 0,40 (n=26)	9,60 ± 3,92 (n=25)	8,05 ± 0,93 (n=53)	31,72 ± 2,47 (n=59)	0,65 ± 0,13 (n=20)	7,73 ± 0,87 (n=20)

Abbildung 10: IDEC weisen eine erhöhte Expression von CD16, CD32 und CD64 auf

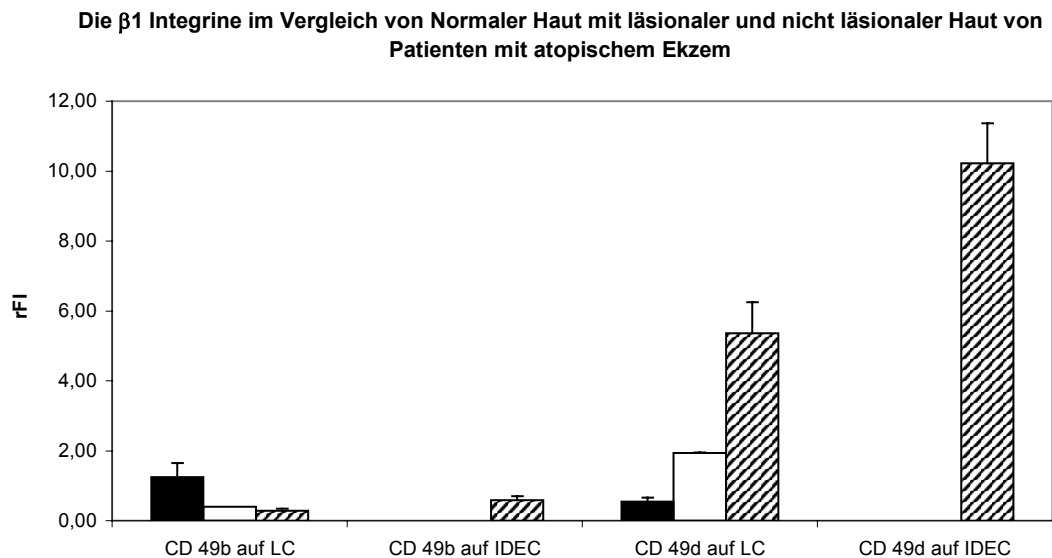
IDEC unterscheiden sich von LC durch eine erhöhte Expression aller IgG Rezeptoren. Insbesondere CD32 wird in läSIONALER Haut bei AE von IDEC besonders stark exprimiert. LC exprimieren in keiner der drei untersuchten Gruppen CD16 oder CD64. CD32 wird von LC auch in NH von gesunden Spendern exprimiert. NH bei AE aber auch läSIONALE Haut bei AE zeigt demgegenüber keine verstärkte CD32 Expression. Hier dargestellt die rFIs des jeweiligen Markers (y-Achse).

3.3.3 Die β 1 Integrine CD49b und CD49d

Für CD49b ergab sich für keine der drei Gruppen auf Langerhans Zellen oder IDEC eine nachweisbare Oberflächenexpression.

CD49d war auf Langerhans Zellen aus normaler Haut nicht exprimiert. Demgegenüber war dieses Molekül auf Langerhans Zellen aus nicht-läSIONALER Haut von Patienten mit atopischem Ekzem bereits eindeutig nachweisbar. Die höchsten Expressionswerte auf LC

von CD49d fanden sich in der läSIONalen Haut bei atopischem Ekzem. IDEC zeigten gegenüber Langerhans Zellen wieder erhöhte Expressionswerte (Abbildung 11).



	CD 49b auf LC	CD 49b auf IDEC	CD 49d auf LC	CD 49d auf IDEC
Normale Haut	1,25 ± 0,41 (n=8)	n.a.	0,55 ± 0,11 (n=11)	n.a.
Normale Haut bei AE	0,40 ± 0,00 (n=1)	n.a.	1,93 ± 0,02 (n=2)	n.a.
Läsion bei AE	0,28 ± 0,06 (n=13)	0,58 ± 0,12 (n=13)	5,36 ± 0,89 (n=28)	10,23 ± 1,14 (n=28)

Abbildung 11: Auf LC und IDEC läSIONaler Haut beim atopischen Ekzem lässt sich das $\beta 1$ Integrin CD49d nachweisen

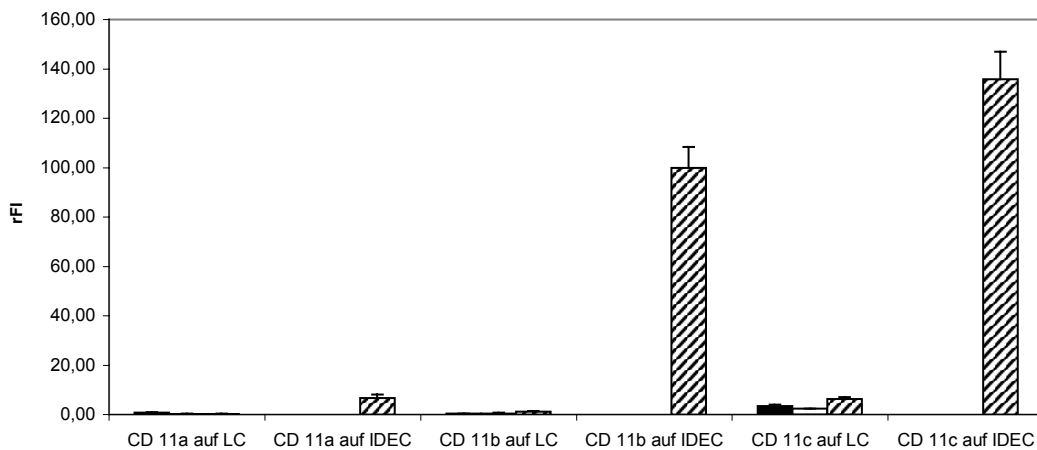
Während das $\beta 1$ Integrin CD49b für keine der drei Gruppen nachweisbar war, wiesen LC sowohl in nicht-läSIONaler (weiße Balken) als auch läSIONaler atopischer Haut (gestreifte Balken) eine erhöhte CD49d Expression auf. Durch die erhöhten Expressionswerte von CD49d unterschied sich nicht-läSIONale Haut bei AE (weiße Balken) deutlich von NH von gesunden Spendern (schwarze Balken). IDEC aus läSIONaler Haut von Pat. mit AE zeigten die höchsten Expressionswerte von CD49d (gestreifte Balken). Hier dargestellt als rFI des jeweiligen Markers (y-Achse).

3.3.4 Die $\beta 2$ Integrine CD11a, CD11b und CD11c

Für Langerhans Zellen wurde in normaler Haut und in nicht-läSIONaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem nur für CD11c eine geringe Expression nachgewiesen. Bezüglich der Expression der $\beta 2$ Integrine ergab sich somit kein Unterschied zwischen NH von

gesunden Spendern und nicht-läsionaler Haut von Patienten mit AE. In läsionaler Haut konnte auf Langerhans Zellen auch ein minimaler Anstieg von CD11b sowie ein eindeutiger Anstieg von CD11c nachgewiesen werden. Auf IDEC aus Läsionen eines atopischen Ekzems gehörten die $\beta 2$ Integrine CD11b und CD11c zu den am stärksten exprimierten Molekülen.

Die $\beta 2$ Integrine im Vergleich von Normaler Haut mit läsionaler und nicht läsionaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem



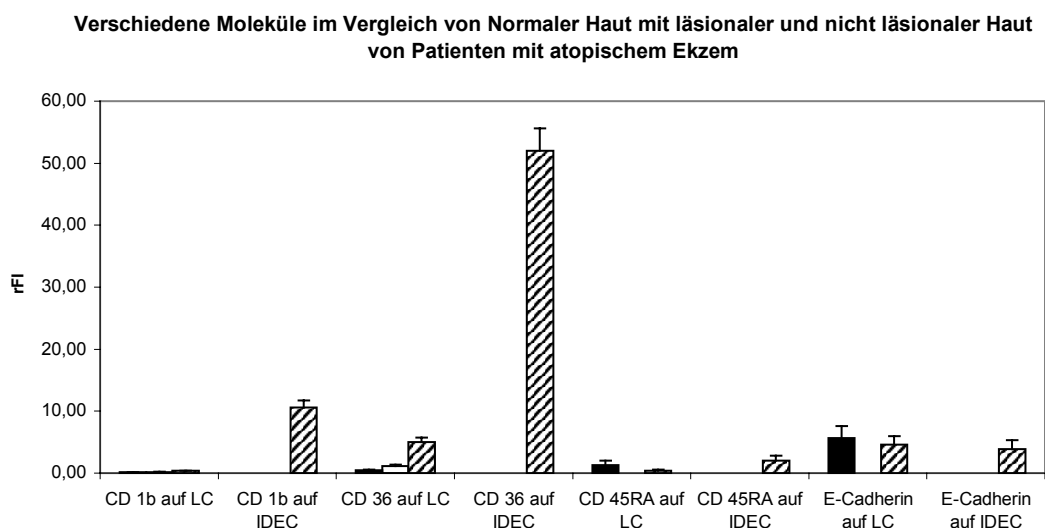
	CD 11a auf LC	CD 11a auf IDEC	CD 11b auf LC	CD 11b auf IDEC	CD 11c auf LC	CD 11c auf IDEC
Normale Haut	0,80 ± 0,29 (n=10)	n.a.	0,36 ± 0,11 (n=17)	n.a.	3,39 ± 0,61 (n=10)	n.a.
Normale Haut bei AE	0,15 ± 0,15 (n=2)	n.a.	0,47 ± 0,25 (n=2)	n.a.	2,40 ± 0,06 (n=2)	n.a.
Läsion bei AE	0,28 ± 0,05 (n=26)	6,74 ± 1,44 (n=27)	1,24 ± 0,19 (n=33)	99,92 ± 8,57 (n=35)	6,34 ± 0,82 (n=26)	135,94 ± 11,04 (n=27)

Abbildung 12: Deutliche Erhöhung der $\beta 2$ Integrine auf IDEC in läsionaler Haut beim atopischen Ekzem gegenüber normaler Haut

In normaler Haut von Pat. ohne Dermatose (schwarze Balken) als auch in nicht-läsionaler Haut von Pat. mit AE (weiße Balken) fanden sich auf LC lediglich für CD11c gering erhöhte Expressionswerte. In läsionaler Haut von Pat. mit AE (gestreifte Balken) war auf LC ebenfalls nur CD11c nachweisbar. Im Kontrast hierzu gehören v.a. CD11b und CD11c auf IDEC zu den am stärksten exprimierten Molekülen. Auf der y-Achse aufgetragen sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

3.3.5 Verschiedene CD-klassifizierte Moleküle

Von den in Abbildung 13 dargestellten Molekülen sind beim atopischen Ekzem vor allem CD1b und CD36 von Bedeutung. Auf IDEC der läsionalen Haut bei AE waren beide Moleküle stark exprimiert. Auf LC konnte für CD1b und CD36 kein wesentlicher Unterschied zwischen der NH von gesunden Spendern und der nicht-läsionalen Haut von Patienten mit AE festgestellt werden.



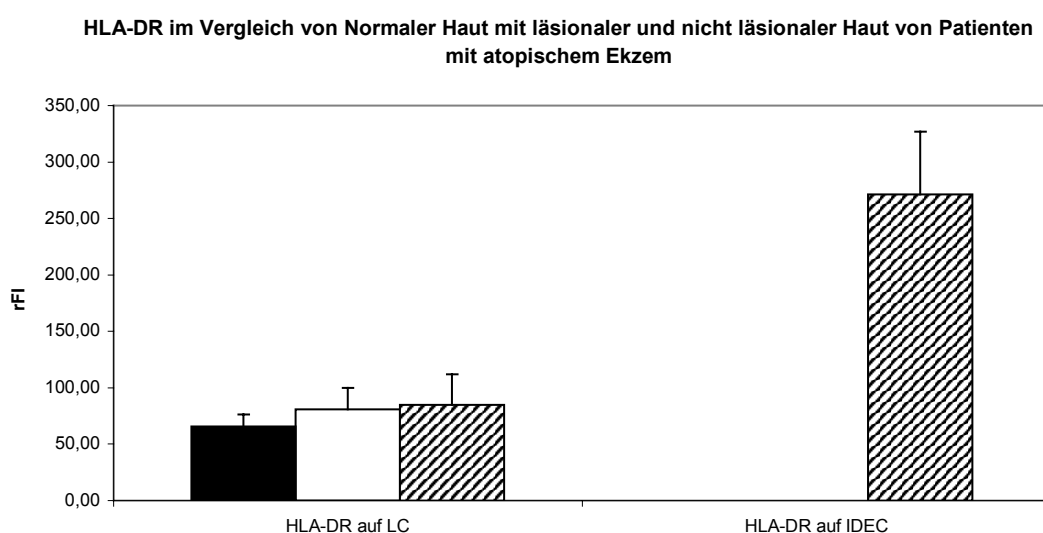
	CD 1b auf LC	CD 1b auf IDEC	CD 36 auf LC	CD 36 auf IDEC	D45RA auf LC	D45RA auf IDEC	E-Cadherin LC	E-Cadherin IDEC
Normale Haut	0,14 ± 0,05 (n=20)	n.a.	0,50 ± 0,10 (n=23)	n.a.	1,27 ± 0,75 (n=5)	n.a.	5,69 ± 1,89 (n=6)	n.a.
Normale Haut bei AE	0,17 ± 0,08 (n=5)	n.a.	1,13 ± 0,24 (n=5)	n.a.	0,00 ± 0,00 (n=0)	n.a.	0,00 ± 0,00 (n=0)	n.a.
Läsion bei AE	0,37 ± 0,06 (n=47)	10,63 ± 1,10 (n=52)	5,03 ± 0,70 (n=46)	51,99 ± 3,65 (n=51)	0,40 ± 0,16 (n=8)	2,03 ± 0,84 (n=8)	4,60 ± 1,39 (n=15)	3,84 ± 1,45 (n=14)

Abbildung 13: IDEC weisen eine erhöhte Oberflächenexpression von CD1b und CD36 in den Läsionen des AE auf

CD36 und CD1b sind auf IDEC in der läsionalen Haut des AE (gestreifte Balken) stark exprimiert. NH von gesunden Spendern und nicht-läsionale Haut von Patienten mit AE unterscheidet sich bezüglich der CD36 und CD1b Expression auf LC nicht. Auf der y-Achse aufgetragen sind die rFI's der Expression des jeweiligen Markers.

3.3.6 HLA-DR

Das zum MHC II gehörende Molekül HLA-DR war auf Langerhans Zellen in normaler Haut eines der am stärksten exprimierten Moleküle. Bei Patienten mit atopischem Ekzem fanden sich auf LC aus nicht entzündlicher Haut ähnliche Werte wie in normaler Haut von gesunden Patienten. IDEC, die in die Läsionen des atopischen Ekzems einwandern, zeigten gegenüber Langerhans Zellen eine um den Faktor drei höhere Expression von HLA-DR.



	HLA-DR auf LC	HLA-DR auf IDEC
Normale Haut	65,82 ± 10,78 (n=6)	n.a.
Normale Haut bei AE	80,83 ± 18,96 (n=4)	n.a.
Läsion bei AE	84,70 ± 27,30 (n=6)	271,39 ± 55,57 (n=7)

Abbildung 14: Die HLA-DR Expression auf LC unterscheidet sich nicht für normale Haut und nicht-läsionale Haut bei AE

Auf Langerhans Zellen zeigte sich zwischen den drei untersuchten Gruppen kein Unterschied bezüglich der HLA-DR Expression. Auf IDEC ist HLA-DR um den Faktor drei stärker exprimiert. Expressionsstärken wurden wieder als rFI auf der y-Achse angegeben

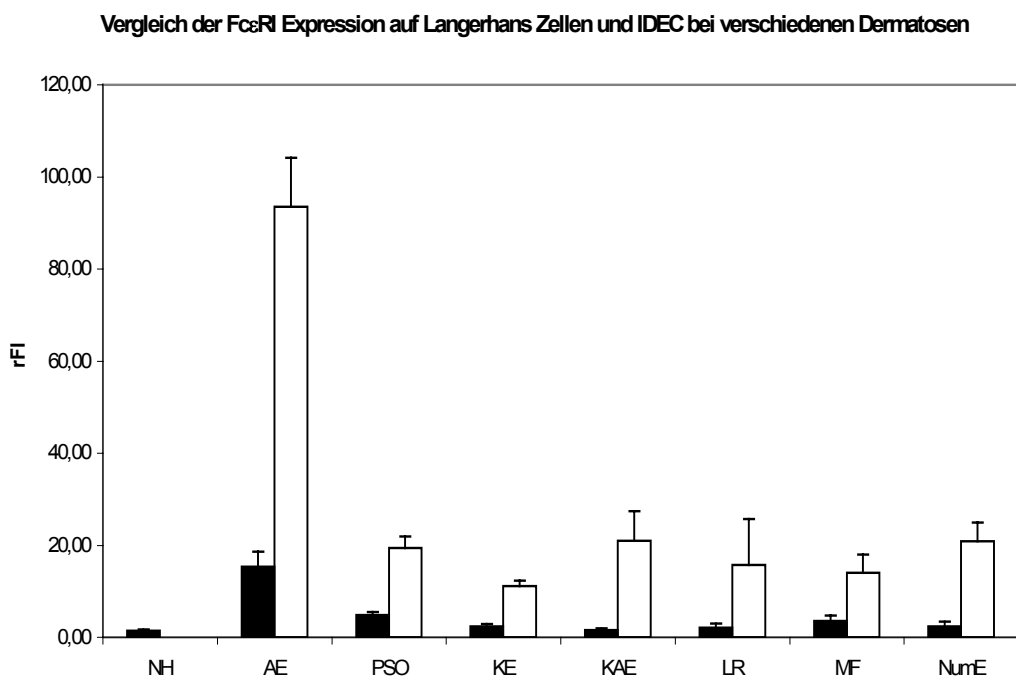
3.4 Vergleich des Phänotyps von LC und IDEC bei verschiedenen Dermatosen

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, die eine dramatische Veränderung des Phänotyps von Langerhans Zellen und IDEC in entzündlich veränderter Epidermis gegenüber normaler Haut zeigen konnten, stellten wir uns die Frage, ob es sich bei den gezeigten Veränderungen lediglich um eine Reaktion auf eine unspezifische Entzündung handelt, oder ob der Phänotyp der Antigen präsentierenden Zellen in Abhängigkeit von einer zugrundeliegenden Krankheit spezifisch beeinflusst wird. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei wurden alle untersuchten Diagnosen auf signifikante Unterschiede in der Expression der von uns untersuchten Moleküle verglichen. Die Ergebnisse dieser Testung sind jeweils getrennt für LC und IDEC in tabellarischer Form unterhalb der zugehörigen Abbildungen gezeigt. Die Tabellen enthalten die für die Abgrenzung von jeweils zwei Diagnosen ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten. Dabei sind in der Tabelle Irrtumswahrscheinlichkeiten mit einem $p < 0,05$ fett gedruckt. Für diesen Wert wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der jeweils bestimmten Rezeptorexpression auf dem spezifizierten Zelltyp ausgegangen.

3.4.1 Der hochaffine IgE Rezeptor FcεRI

Vergleicht man die FcεRI Rezeptorexpression auf Langerhans Zellen, so ergibt sich im Vergleich mit anderen Diagnosen eine signifikant erhöhte Expression für die läSIONALE Haut von Patienten mit atopischem Ekzem. Gegenüber normaler Haut zeigten auch die meisten der anderen untersuchten Diagnosen eine erhöhte FcεRI Expression auf Langerhans Zellen. Für keine Diagnose konnte aber eine ähnlich hohe FcεRI Expression auf Langerhans Zellen festgestellt werden wie beim atopischen Ekzem. Noch deutlicher wird die Abgrenzung des atopischen Ekzems von anderen Diagnosen durch die Betrachtung der FcεRI Expression auf den IDEC möglich gemacht. Wie für andere

Moleküle gilt, dass FcεRI auf IDEC bei allen Diagnosen stärker exprimiert war als auf Langerhans Zellen. Die Expressionsstärke war für alle Diagnosen außer dem atopischen Ekzem mit einem rFI, der zwischen 10 und 20 lag, relativ einheitlich. Die 5 mal höhere Expression von FcεRI auf IDEC bei atopischem Ekzem lässt eine eindeutige Abgrenzung dieser Diagnose von den anderen untersuchten Diagnosen zu und bildet die Grundlage einer hochsensitiven Methode zur Differenzierung der verschiedenen Diagnosen (siehe Abschnitt 3.5).



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
FcεRI LC	1,40 ± 0,25 (n=31)	15,30 ± 3,30 (n=54)	4,87 ± 0,68 (n=36)	2,32 ± 0,60 (n=18)	1,62 ± 0,29 (n=14)	2,06 ± 0,95 (n=6)	3,54 ± 1,19 (n=5)	2,33 ± 1,10 (n=6)
FcεRI IDEC	0,00 (n=1)	93,49 ± 10,67 (n=59)	19,37 ± 2,52 (n=41)	11,08 ± 1,30 (n=20)	21,02 ± 6,38 (n=14)	15,73 ± 9,95 (n=6)	14,02 ± 3,90 (n=7)	20,91 ± 4,05 (n=7)

Abbildung 15: Eine hohe FcεRI Expression auf LC und IDEC ist charakteristisch für das atopische Ekzem

Der hochaffine IgE Rezeptor FcεRI wird insbesondere auf LC (schwarze Balken) und IDEC (weiße Balken) beim atopischen Ekzem (AE) verstärkt exprimiert. Demgegenüber ist die Expression von FcεRI bei allen anderen untersuchten Diagnosen sowohl auf LC als auch auf IDEC deutlich geringer. Auf der y-Achse aufgetragen sind die rFI's der FcεRI Expression.

FcεRI-LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,0001	0,0001	0,17	0,321	0,855	0,23	0,481
AE	0,0001		0,005	0,0001	0,0001	0,002	0,102	0,005
PSO	0,0001	0,005		0,005	0,001	0,042	0,6	0,058
KE	0,17	0,0001	0,005		0,667	0,53	0,205	0,925
KAE	0,321	0,0001	0,001	0,667		0,782	0,112	0,97
LR	0,855	0,002	0,042	0,53	0,782		0,25	0,939
MF	0,23	0,102	0,6	0,205	0,112	0,25		0,247
Num-E	0,481	0,005	0,058	0,925	0,97	0,939	0,247	

FcεRI-IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
PSO	n.a.	0,0001		0,064	0,753	0,175	0,545	0,406
KE	n.a.	0,0001	0,064		0,466	0,424	0,536	0,045
KAE	n.a.	0,0001	0,753	0,466		0,243	0,523	0,441
LR	n.a.	0,0001	0,175	0,424	0,243		0,639	0,136
MF	n.a.	0,0001	0,545	0,536	0,523	0,639		0,21
Num-E	n.a.	0,0001	0,406	0,045	0,441	0,136	0,21	

Tabelle 1: Vergleich der FcεRI Expression für verschiedene Dermatosen im Mann-Whitney-U-Test

Es zeigt sich bei entzündlichen Dermatosen eine erhöhte Expression von FcεRI auf LC im Vergleich mit normaler Haut. Diese ist für AE und PSO hoch signifikant. Die starke Expression von FcεRI auf IDEC ist für das AE kennzeichnend und grenzt das AE gegenüber allen anderen Diagnosen hochsignifikant ab.

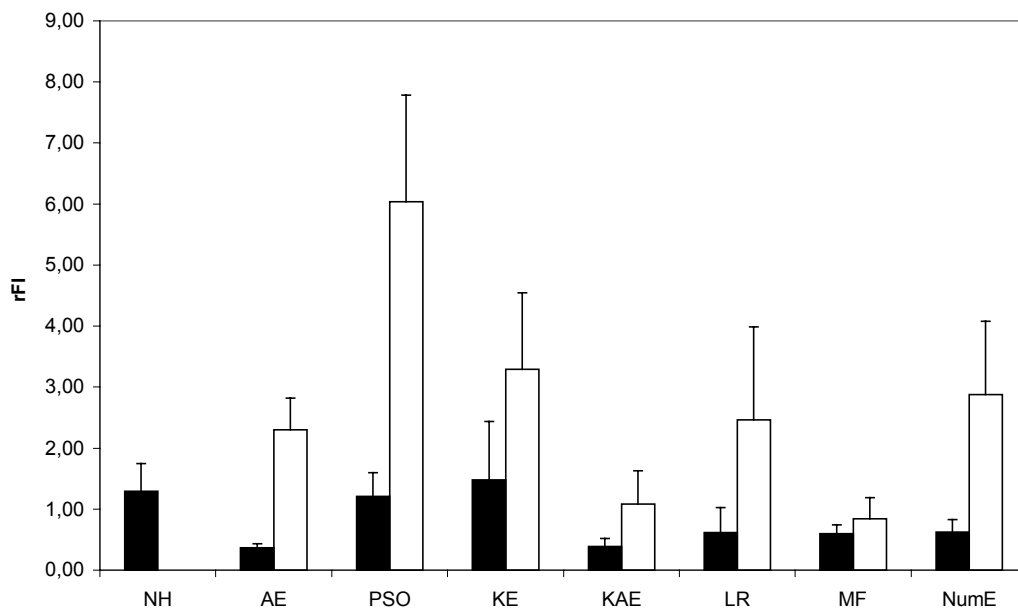
Für IDEC ergab sich, dass die Bestimmung der Expression von FcεRI eine Abgrenzung des atopischen Ekzems von allen anderen untersuchten Diagnosen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ ermöglicht. Das hohe Signifikanzniveau, das bei der Abgrenzung des atopischen Ekzems sowie der Psoriasis von anderen Diagnosen erreicht werden konnte, ist auch auf die hohen Fallzahlen bei diesen Diagnosen zurückzuführen.

3.4.2 Der niedrigaffine IgE Rezeptor CD23

Die passive Anlagerung von löslichem CD23 an Langerhans Zellen war für alle Diagnosen nur sehr gering ausgeprägt und erlaubt lediglich eine statistisch signifikante Abgrenzung von atopischem Ekzem und Psoriasis. IDEC zeigten demgegenüber eine stärker ausgeprägte Anlagerung von sCD23. Dies ist auf die hohe Expression von CD11b und CD11c auf IDEC zurückzuführen, da CD23 sich an diese $\beta 2$ Integrine anlagert [52].

Durch die Bestimmung des an IDEC angelagerten sCD23 ergab sich nur die Möglichkeit, die Psoriasis von der Patientengruppe mit allergischem Kontaktekzem bei atopischer Diathese (KAE) zu unterscheiden.

Vergleich der CD23 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD23 LC	1,30 ± 0,45 (n=20)	0,36 ± 0,07 (n=43)	1,21 ± 0,39 (n=33)	1,48 ± 0,96 (n=13)	0,39 ± 0,13 (n=11)	0,62 ± 0,41 (n=3)	0,60 ± 0,14 (n=4)	0,62 ± 0,21 (n=6)
CD23 IDEC	0,00 (n=1)	2,30 ± 0,52 (n=47)	6,04 ± 1,75 (n=37)	3,29 ± 1,26 (n=17)	1,08 ± 0,55 (n=11)	2,46 ± 1,52 (n=3)	0,84 ± 0,35 (n=4)	2,88 ± 1,20 (n=7)

Abbildung 16: CD23 wird in besonders hohem Maße von IDEC bei der Psoriasis exprimiert

Insbesondere bei der Psoriasis ist die Expression von CD23 auf IDEC (weiße Balken) erhöht. (dargestellt als rFI der CD23 Expression auf der y-Achse).

CD23 LC		AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,135	0,806	0,678	0,276	0,76	0,674	0,977
AE	0,135		0,032	0,631	0,948	0,685	0,098	0,162
PSO	0,806	0,032		0,311	0,22	0,915	0,649	0,894
KE	0,678	0,631	0,311		0,48	0,901	0,339	0,515
KAE	0,276	0,948	0,22	0,48		0,771	0,393	0,515
LR	0,76	0,685	0,915	0,901	0,771		0,859	0,773
MF	0,674	0,098	0,649	0,339	0,393	0,859		0,76
Num-E	0,977	0,162	0,894	0,515	0,515	0,773	0,76	

CD23 IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
AE	n.a		0,078	0,167	0,501	0,828	0,958	0,174
PSO	n.a	0,078		0,842	0,049	0,728	0,334	0,875
KE	n.a	0,167	0,842		0,117	1	0,569	0,763
KAE	n.a	0,501	0,049	0,117		0,553	0,548	0,084
LR	n.a	0,828	0,728	1	0,553		0,632	0,83
MF	n.a	0,958	0,334	0,569	0,548	0,632		0,312
Num-E	n.a	0,174	0,875	0,763	0,084	0,83	0,312	

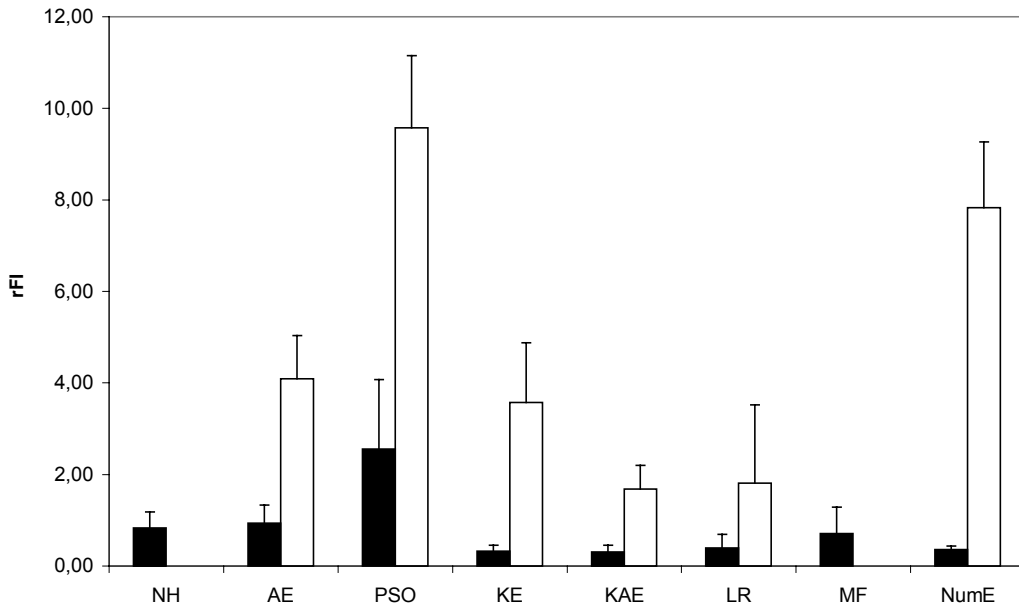
Tabelle 2: Vergleich der CD23 Expression für verschiedene Dermatosen im Mann-Whitney-U-Test

Trotz der erhöhten CD23 Expression für PSO auf IDEC ergab sich hierdurch nur eine Abgrenzungsmöglichkeit der PSO von KAE. Die CD23 Expression auf LC war für AE gegenüber PSO signifikant vermindert.

3.4.3 Der niedrigaffine IgG Rezeptor CD16

Auf Langerhans Zellen konnte nur bei der Psoriasis eine nennenswerte CD16 Expression festgestellt werden, die im wesentlichen auf IDEC beschränkt blieb. Die erhöhte Expression von CD16 auf IDEC ermöglicht die Abgrenzung der Psoriasis von atopischem Ekzem und allergischem Kontaktekzem.

Vergleich der CD16 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD16 LC	0,83 ± 0,35 (n=8)	0,93 ± 0,40 (n=26)	2,56 ± 1,52 (n=16)	0,32 ± 0,13 (n=6)	0,30 ± 0,15 (n=9)	0,39 ± 0,30 (n=2)	0,71 ± 0,58 (n=2)	0,36 ± 0,08 (n=3)
CD16 IDEC	n.a.	4,09 ± 0,94 (n=25)	9,57 ± 1,58 (n=18)	3,58 ± 1,30 (n=8)	1,68 ± 0,52 (n=9)	1,81 ± 1,70 (n=2)	n.a.	7,83 ± 1,43 (n=3)

Abbildung 17: Die Psoriasis führt zu einer hohen CD16 Expression auf IDEC

Der IgG Rezeptor CD16 wird von LC (schwarze Balken) und IDEC (weiße Balken) bei Psoriasis verstärkt exprimiert. Eine erhöhte Expression dieses Markers auf IDEC findet sich auch beim nummulären Ekzem (NumE), dargestellt als rFI der CD16 Oberflächenexpression auf der y-Achse.

CD16 LC		AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,949	0,373	0,636	0,479	1	1	0,888
AE	0,949		0,055	0,548	0,226	0,961	0,702	0,864
PSO	0,373	0,055		0,034	0,005	0,392	0,732	0,209
KE	0,636	0,548	0,034		0,684	0,786	0,612	0,849
KAE	0,479	0,226	0,005	0,684		0,577	0,58	0,374
LR	1	0,961	0,392	0,786	0,577		0,672	1
MF	1	0,702	0,732	0,612	0,58	0,672		1
Num-E	0,888	0,864	0,209	0,849	0,374	1	1	

CD16 IDEC		AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,003	0,735	0,105	0,445	n.d.	0,2
PSO	n.a.	0,003		0,023	0,0001	0,095	n.d.	1
KE	n.a.	0,735	0,023		0,322	0,713	n.d.	0,131
KAE	n.a.	0,105	0,0001	0,322		1	n.d.	0,009
LR	n.a.	0,445	0,095	0,713	1		n.d.	0,203
MF	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
Num-E	n.a.	0,2	1	0,131	0,009	0,203	n.d.	

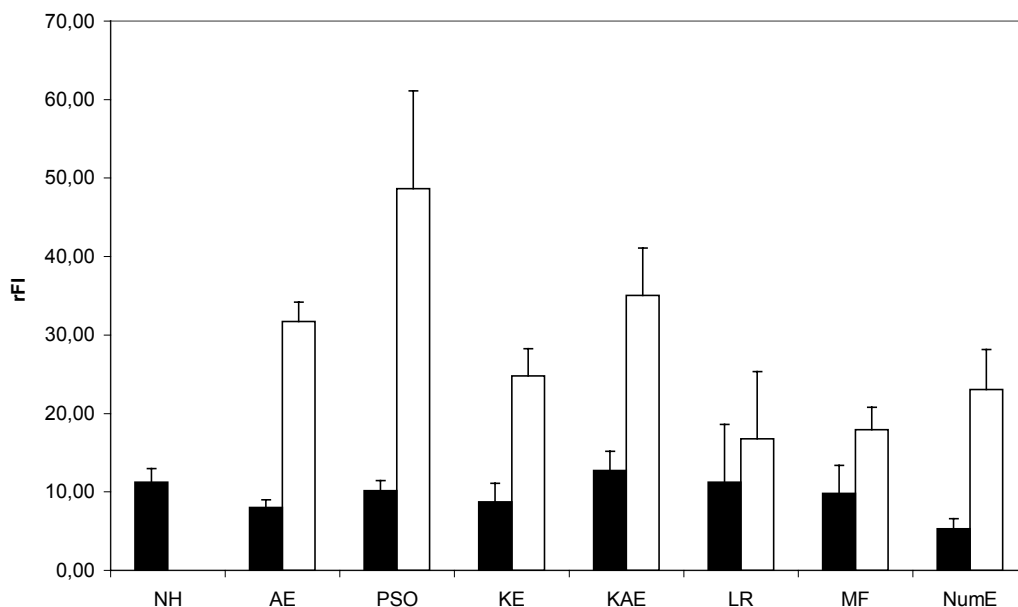
Tabelle 3: Die CD16 Expression ermöglicht die Abgrenzung der PSO von AE, KE und KAE

Das Profil der CD16 Expression auf IDEC ermöglicht eine signifikante Abgrenzung der Psoriasis-Läsionen von den Läsionen des atopischen Ekzems einerseits, sowie von den Läsionen des allergischen Kontaktekzems sowohl bei Atopikern als auch bei Nichtatopikern andererseits.

3.4.4 Der niedrigaffine IgG Rezeptor CD32

Für CD32 ergab sich auf LC eine relativ konstante Expression über die verschiedenen Diagnosen hinweg. Die rFI's lagen dabei zwischen 8 und 12,7. Insbesondere ergaben sich auf LC auch im Vergleich zwischen den untersuchten Dermatosen und normaler Haut keine wesentlich veränderten Expressionsstärken. Durch die höhere Expression von CD32 auf LC und IDEC bei der Psoriasis ist die Abgrenzung der Psoriasis vom atopischen Ekzem möglich.

Vergleich der CD32 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD32 LC	11,26 ± 1,71 (n=31)	8,05 ± 0,93 (n=53)	10,17 ± 1,29 (n=36)	8,72 ± 2,35 (n=18)	12,70 ± 2,49 (n=14)	11,22 ± 7,37 (n=6)	9,82 ± 3,55 (n=5)	5,32 ± 1,29 (n=6)
CD32 IDEC	0,00 (n=1)	31,72 ± 2,47 (n=59)	48,65 ± 12,44 (n=39)	24,78 ± 3,50 (n=20)	35,05 ± 6,01 (n=14)	16,78 ± 8,57 (n=6)	17,95 ± 2,85 (n=7)	23,06 ± 5,08 (n=7)

Abbildung 18: CD32 ist auf IDEC in den Hautläsionen bei Psoriasis erhöht

Der niedrigaffine IgG Rezeptor CD32 ist insbesondere auf IDEC bei der Psoriasis (weiße Balken), aber auch beim Kontaktekzem (KE und KAE) und dem atopischen Ekzem (AE) gegenüber anderen entzündlichen Dermatosen erhöht. Dagegen ist die Expression dieser Struktur auf LC (schwarze Balken) bei allen Dermatosen im wesentlichen gleich verteilt.

CD32 LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,108	0,914	0,239	0,596	0,201	0,828	0,153
AE	0,108		0,05	0,943	0,065	0,353	0,615	0,543
PSO	0,914	0,05		0,16	0,488	0,201	0,893	0,063
KE	0,239	0,943	0,16		0,158	0,346	0,542	0,624
KAE	0,596	0,065	0,488	0,158		0,211	0,503	0,108
LR	0,201	0,353	0,201	0,346	0,211		0,33	0,581
MF	0,828	0,615	0,893	0,542	0,503	0,33		0,427
Num-E	0,153	0,543	0,063	0,624	0,108	0,581	0,427	

CD32 IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
AE	n.a		0,269	0,153	0,697	0,038	0,062	0,294
PSO	n.a	0,269		0,038	0,675	0,024	0,012	0,099
KE	n.a	0,153	0,038		0,159	0,159	0,375	0,769
KAE	n.a	0,697	0,675	0,159		0,078	0,173	0,357
LR	n.a	0,038	0,024	0,159	0,078		0,373	0,233
MF	n.a	0,062	0,012	0,375	0,173	0,373		0,456
Num-E	n.a	0,294	0,099	0,769	0,357	0,233	0,456	

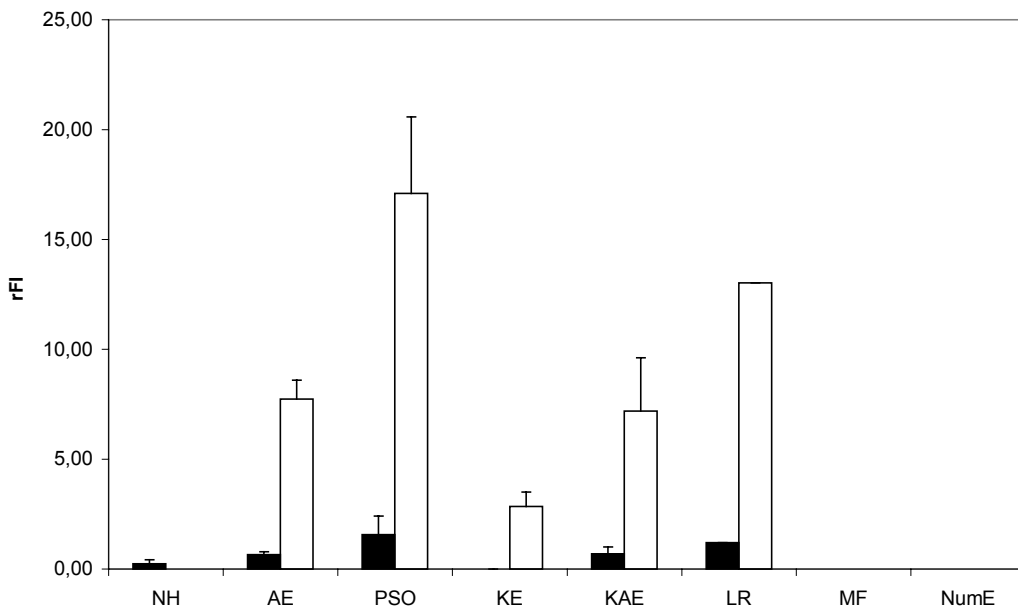
Tabelle 4: Vergleich der CD32 Expression für verschiedene Dermatosen im Mann-Whitney –U-Test

CD32 auf IDEC ermöglicht die Abgrenzung der Psoriasis von KE, LR und MF einerseits, sowie die Abgrenzung AE gegenüber LR andererseits.

3.4.5 Der hochaffine IgG Rezeptor CD64

Wie bereits die anderen IgG Rezeptoren zeigte CD64 seine höchste Expression bei der Psoriasis. Bei den von uns untersuchten Dermatosen ermöglichte CD64 keine Abgrenzungen, die nicht bereits durch die anderen IgG Rezeptoren möglich waren. Aufgrund seiner hohen Expression auf IDEC bei Psoriasispatienten kann man die CD64 Expression allerdings als Grundlage einer hochsensitiven Methode zur Abgrenzung der Psoriasis von anderen Diagnosen benutzen. Diese Methode ist unter 3.5 beschrieben.

Vergleich der CD64 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD64 LC	0,24 ± 0,18 (n=5)	0,65 ± 0,13 (n=20)	1,58 ± 0,84 (n=7)	0,00 ± 0,00 (n=2)	0,70 ± 0,31 (n=8)	1,20 (n=1)	n.a.	n.a.
CD64 IDEC	n.a.	7,73 ± 0,87 (n=20)	17,11 ± 3,48 (n=7)	2,85 ± 0,65 (n=2)	7,19 ± 2,42 (n=8)	13,03 (n=1)	n.a.	n.a.

Abbildung 19: CD64 ist auf IDEC in läSIONALER Haut bei Psoriasis erhöht

Der hochaffine IgG Rezeptor CD64 ist auf IDEC in den Hautläsionen der Psoriasis (Pso) besonders stark exprimiert (weiße Balken). Zudem zeigten einzelne Patienten eine verstärkte Expression dieser Struktur bei Lichen ruber (LR) und dem Kontaktekzem bei Patienten mit atopischer Diathese (KAE). Der rFI der CD64 Expression ist auf der y-Achse dargestellt.

CD64 LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,066	0,141	0,433	0,173	0,168	n.d.	n.d.
AE	0,066		0,686	0,045	0,978	0,381	n.d.	n.d.
PSO	0,141	0,686		0,058	0,863	1	n.d.	n.d.
KE	0,433	0,045	0,058		0,11	0,334	n.d.	n.d.
KAE	0,173	0,978	0,863	0,11		0,44	n.d.	n.d.
LR	0,168	0,381	1	0,334	0,44		n.d.	n.d.
MF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
Num-E	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

CD64 IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,031	0,108	0,434	0,286	n.d.	n.d.
PSO	n.a.	0,031		0,053	0,029	0,759	n.d.	n.d.
KE	n.a.	0,108	0,053		0,535	0,66	n.d.	n.d.
KAE	n.a.	0,434	0,029	0,535		0,663	n.d.	n.d.
LR	n.a.	0,286	0,759	0,66	0,663		n.d.	n.d.
MF	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
Num-E	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

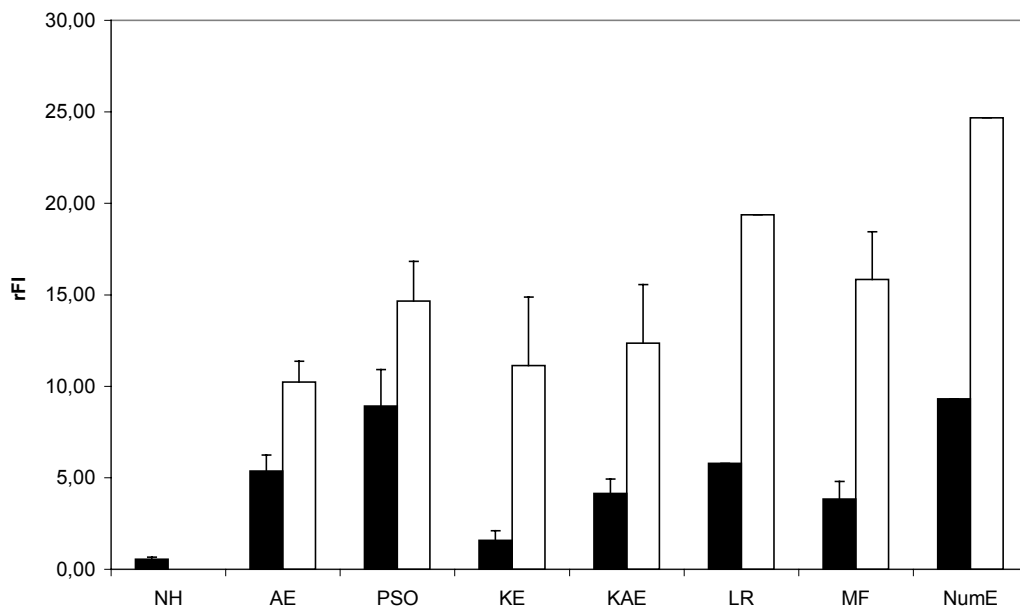
Tabelle 5: CD64 auf IDEC grenzt die Psoriasis von AE und KAE ab

Die starke Expression von CD64 auf IDEC bei der Psoriasis (PSO) ermöglicht die signifikante Abgrenzung dieser Diagnose vom atopischen Ekzem (AE) sowie dem Kontaktekzem bei Patienten mit allergischer Diathese (KAE).

3.4.6 Das $\beta 1$ Integrin CD49d

Die α -Kette CD49d des $\beta 1$ Integrins VLA-4 war auf LC aus normaler Haut nicht exprimiert. Bei allen von uns untersuchten Dermatosen, mit Ausnahme des Kontaktekzems, war hingegen eine verstärkte Expression dieses Moleküls gegenüber normaler Haut auf LC festzustellen. Durch die Phänotypisierung von CD49d auf LC war es möglich, das Kontaktekzem von Läsionen des atopischen Ekzems und der Psoriasis eindeutig abzugrenzen.

Vergleich der CD49d Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD49d LC	0,55 ± 0,11 (n=11)	5,36 ± 0,89 (n=28)	8,93 ± 1,98 (n=17)	1,57 ± 0,53 (n=5)	4,14 ± 0,78 (n=11)	5,78 (n=1)	3,84 ± 0,96 (n=3)	9,32 (n=1)
CD49d IDEC	n.a.	10,23 ± 1,14 (n=28)	14,67 ± 2,16 (n=19)	11,14 ± 3,74 (n=6)	12,36 ± 3,21 (n=11)	19,38 (n=1)	15,84 ± 2,62 (n=3)	24,67 (n=1)

Abbildung 20: Das $\beta 1$ Integrin CD49d wird auf LC beim KE nur schwach exprimiert

LC in der läSIONalen Haut des KE exprimieren das $\beta 1$ Integrin CD49d nur schwach (schwarze Balken). Alle anderen inflammatorischen Diagnosen zeigen eine erhöhte CD49d Expression auf LC. Liegt eine entzündliche Dermatose vor, so ergibt eine niedrige CD49d Expression auf LC einen Hinweis auf das Vorliegen eines Kontaktekzems. Auf IDEC findet sich für alle Dermatosen eine krankheitsunabhängige, hohe Expression (weiße Balken). Der rFI der CD49d Expression ist auf der y-Achse dargestellt.

Schwierig ist allerdings die Abgrenzung atopischer Patienten mit Kontaktekzem (KAE) von Patienten mit atopischem Ekzem (AE). Die CD49d Expression auf LC ergab keine Möglichkeit zur differentialdiagnostischen Abgrenzung dieser beiden Gruppen. Hierzu mussten andere Marker herangezogen werden. Da eine niedrige CD49d Expression auf LC für die Diagnosen normale Haut oder Kontaktekzem spricht, normale Haut aber über die Abwesenheit von IDEC klar abzugrenzen war, gibt eine niedrige CD49d Expression auf LC bei bestehender entzündlicher Dermatose einen Hinweis auf das Vorliegen eines Kontaktekzems.

IDEC zeigten mit rFI's zwischen 10 und 20 eine erhöhte, aber krankheitsunabhängige Expression von CD49d.

CD49d LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	NumE
NH		0,0001	0,0001	0,086	0,0001	0,16	0,006	0,168
AE	0,0001		0,175	0,027	0,841	0,686	1	0,354
PSO	0,0001	0,175		0,024	0,161	1	0,479	0,895
KE	0,086	0,027	0,024		0,026	0,328	0,14	0,329
KAE	0,0001	0,841	0,161	0,026		0,668	0,768	0,339
LR	0,16	0,686	1	0,328	0,668		0,494	1
MF	0,006	1	0,479	0,14	0,768	0,494		0,495
NumE	0,168	0,354	0,895	0,329	0,339	1	0,495	

CD49d IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	NumE
NH		n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
AE	n.a		0,081	0,948	0,794	0,133	0,121	0,073
PSO	n.a	0,081		0,512	0,422	0,705	0,583	0,403
KE	n.a	0,948	0,512		0,961	0,858	0,544	0,284
KAE	n.a	0,794	0,422	0,961		0,668	0,458	0,506
LR	n.a	0,133	0,705	0,858	0,668		1	1
MF	n.a	0,121	0,583	0,544	0,458	1		0,495
NumE	n.a	0,073	0,403	0,284	0,506	1	0,495	

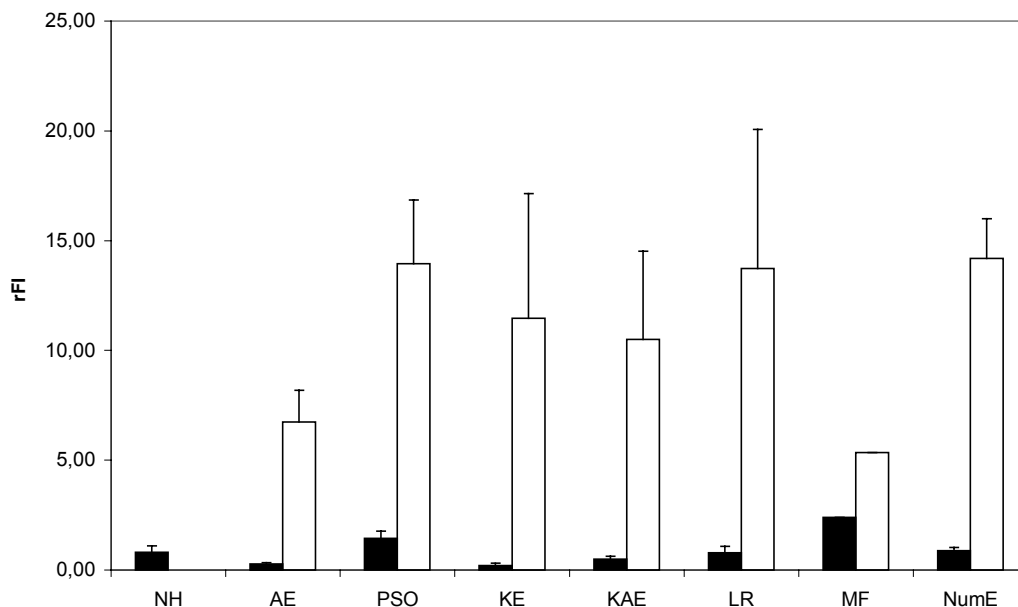
Tabelle 6: Eine niedrige CD49d Expression ist typisch für NH und das Kontaktekzem

Die niedrige CD49d Expression auf LC lässt eine statistisch signifikante Abgrenzung des KE von AE, PSO und KAE zu. Aufgrund der zu geringen Fallzahlen ist eine Abgrenzung von LR, MF und NumE derzeit, trotz der erhöhten Expression von CD49d auf LC bei diesen Diagnosen, noch nicht möglich.

3.4.7 Das $\beta 2$ Integrin CD11a

CD11a gehört, zusammen mit den anderen α -Ketten der $\beta 2$ Integrine, zu den Molekülen, welche die beiden CD1a positiven Zellpopulationen (LC und IDEC) am deutlichsten voneinander abgrenzen. Die hohe Dichte von $\beta 2$ Integrinen auf der Zelloberfläche waren ein typisches Charakteristikum von IDEC.

Vergleich der CD11a Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD11a LC	0,80 ±0,29 (n=10)	0,28 ±0,05 (n=26)	1,44 ±0,33 (n=17)	0,19 ±0,11 (n=5)	0,49 ±0,14 (n=7)	0,79 ±0,28 (n=2)	2,38 (n=1)	0,87 ±0,15 (n=3)
CD11a IDEC	n.a.	6,74 ±1,44 (n=27)	13,95 ±2,91 (n=19)	11,47 ±5,68 (n=7)	10,49 ±4,03 (n=7)	13,73 ±6,33 (n=2)	5,35 (n=1)	14,19 ±1,81 (n=4)

Abbildung 21: Das $\beta 2$ Integrin CD11a wird von IDEC bei allen inflammatorischen Dermatosen stark exprimiert

Bei allen hier untersuchten entzündlichen Dermatosen wiesen IDEC (weiße Balken) eine deutliche Oberflächenexpression von CD11a auf. Auf LC konnte diese Struktur jedoch nur bei der Psoriasis (Pso) und der Mycosis fungoides (MF) nachgewiesen werden. Die CD11a Expression ist als rFI auf der y-Achse dargestellt.

Für CD11a ergaben die Messergebnisse, dass auf IDEC auch die Expressionsstärke dieses Moleküls in einer krankheitsspezifischen Weise moduliert wird. Aufgrund der hohen Schwankungsbreite der einzelnen Messergebnisse bei einer gegebenen Diagnose ließ die Expression von CD11a nur die statistisch signifikante Abgrenzung des atopischen Ekzems von der Psoriasis und dem nummulären Ekzem zu.

LC wiesen bei den meisten Diagnosen keine und bei Diagnosen, wie der Psoriasis und der Mycosis fungoides, eine ausgesprochen geringe Expression von CD11a auf. Aus diesem Grund bot sich CD11a auf LC nicht als Marker zur Differenzierung verschiedener Dermatosen an.

CD11a LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,527	0,149	0,43	0,887	0,746	0,454	0,813
AE	0,527		0,0001	0,384	0,109	0,052	0,039	0,001
PSO	0,149	0,0001		0,007	0,102	0,647	0,671	1
KE	0,43	0,384	0,007		0,103	0,143	0,168	0,038
KAE	0,887	0,109	0,102	0,103		0,327	0,253	0,179
LR	0,746	0,052	0,647	0,143	0,327		0,672	0,806
MF	0,454	0,039	0,671	0,168	0,253	0,672		0,508
Num-E	0,813	0,001	1	0,038	0,179	0,806	0,508	

CD11a IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,023	0,906	0,446	0,176	0,795	0,026
PSO	n.a.	0,023		0,398	0,465	0,855	0,703	0,551
KE	n.a.	0,906	0,398		1	0,5	1	0,317
KAE	n.a.	0,446	0,465	1		0,662	1	0,417
LR	n.a.	0,176	0,855	0,5	0,662		0,672	1
MF	n.a.	0,795	0,703	1	1	0,672		0,398
Num-E	n.a.	0,026	0,551	0,317	0,417	1	0,398	

Tabelle 7: CD11a auf IDEC grenzt AE von PSO und NumE signifikant ab

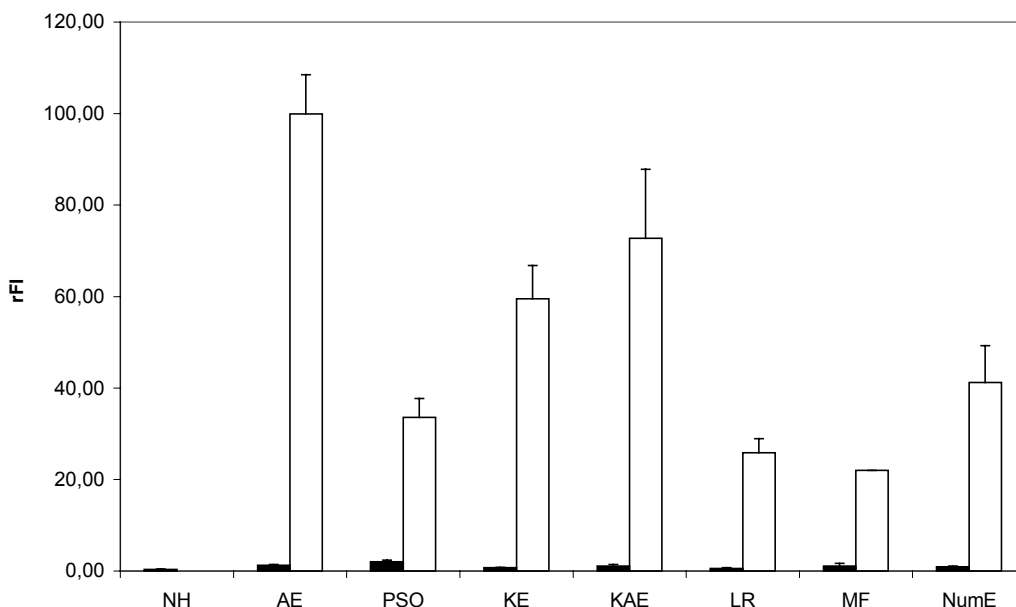
Trotz der hohen Expressionsstärke von CD11a auf IDEC lässt sich die bei AE etwas geringere Expressionsstärke dieses Moleküls nur für die statistisch signifikante Abgrenzung des AE von PSO und NumE verwenden.

3.4.8 Das $\beta 2$ Integrin CD11b

Das Molekül CD11b gehört, zusammen mit CD11a und CD11c, zu den auf IDEC am stärksten exprimierten Molekülen. Es gehörte daher ebenfalls zu den für IDEC charakteristischen Markern und erlaubt eine besonders gute Abgrenzung von IDEC und

LC. Im Vergleich mit CD11a ermöglichte CD11b eine bessere Differenzierung zahlreicher Diagnosen. Die hohe Expression von CD11b auf IDEC beim atopischen Ekzem grenzt dieses von der Psoriasis, dem Kontaktekzem, dem Lichen ruber und dem nummulären Ekzem ab. Eine Abgrenzung von KE und KAE war nicht möglich. Auf LC ist CD11b nur bei der Psoriasis schwach exprimiert.

Vergleich der CD11b Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD11b LC	0,36 ±0,11 (n=17)	1,24 ±0,19 (n=33)	2,04 ±0,30 (n=22)	0,72 ±0,11 (n=9)	1,02 ±0,39 (n=9)	0,56 ±0,18 (n=3)	1,05 ±0,62 (n=3)	0,87 ±0,16 (n=4)
CD11b IDEC	0,00 (n=1)	99,92 ±8,57 (n=35)	33,60 ±4,10 (n=25)	59,54 ±7,23 (n=11)	72,72 ±15,12 (n=9)	25,85 ±3,10 (n=3)	22,01 (n=1)	41,15 ±8,15 (n=5)

Abbildung 22: Das $\beta 2$ Integrin CD11b wird stark von IDEC in läSIONALER HAUT ENTZÜNDLICHER DERMATOSEN EXPRIMIERT

CD11b wird von IDEC in läSIONALER HAUT (weiße Balken) bei allen untersuchten ENTZÜNDLICHER DERMATOSEN EXPRIMIERT. Die höchste CD11b Expression ist auf IDEC beim atopischen Ekzem (AE) zu finden. Auf LC ist diese Struktur hingegen fast nicht exprimiert (schwarze Balken). Der rFI CD11b ist auf der y-Achse dargestellt.

CD11b LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,0001	0,0001	0,009	0,005	0,248	0,17	0,015
AE	0,0001		0,038	0,355	0,459	0,321	0,739	0,799
PSO	0,0001	0,038		0,009	0,065	0,06	0,23	0,115
KE	0,009	0,355	0,009		0,862	0,599	1	0,602
KAE	0,005	0,459	0,065	0,862		0,852	1	0,702
LR	0,248	0,321	0,06	0,599	0,852		1	0,226
MF	0,17	0,739	0,23	1	1	1		0,855
Num-E	0,015	0,799	0,115	0,602	0,702	0,226	0,855	

CD11b IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,0001	0,005	0,153	0,004	0,105	0,002
PSO	n.a.	0,0001		0,001	0,031	0,433	0,612	0,51
KE	n.a.	0,005	0,001		0,502	0,024	0,161	0,216
KAE	n.a.	0,153	0,031	0,502		0,273	0,397	0,237
LR	n.a.	0,004	0,433	0,024	0,273		1	0,144
MF	n.a.	0,105	0,612	0,161	0,397	1		0,663
Num-E	n.a.	0,002	0,51	0,216	0,237	0,144	0,663	

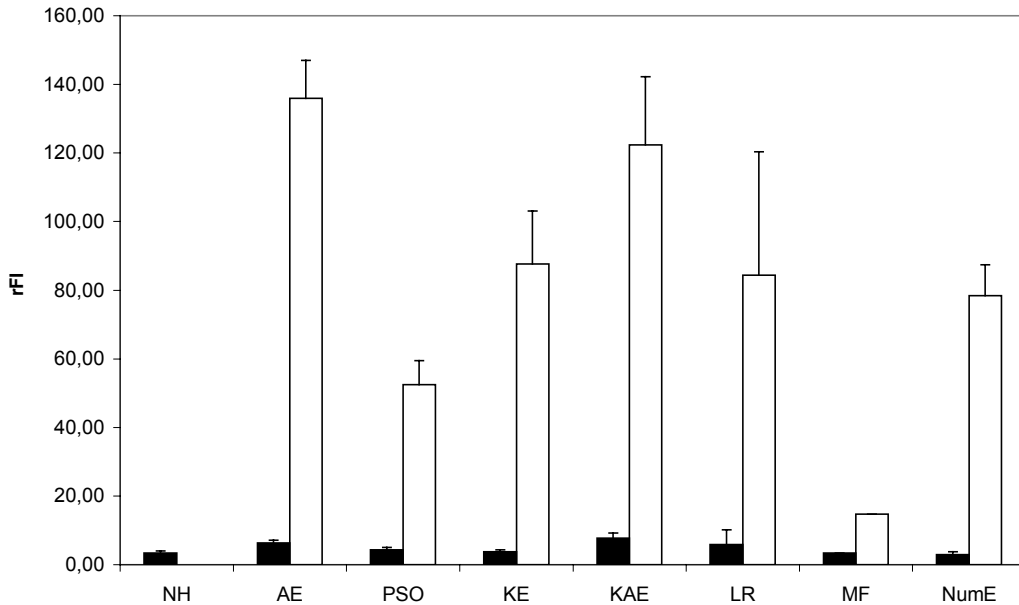
Tabelle 8: Die Expressionsstärke von CD11b auf IDEC ist krankheitsspezifisch

CD11b ist auf IDEC bei allen entzündlichen Dermatosen stark exprimiert. Die Expressionsstärke wird im hohen Maße von der zugrundeliegenden Krankheit moduliert. CD11b auf IDEC erlaubt daher die statistisch signifikante Abgrenzung der Diagnosen für die in Tab. 8 fettgedruckten Diagnosekombinationen mit den jeweils dort angegebenen p Werten für die Irrtumswahrscheinlichkeit.

3.4.9 Das β 2 Integrin CD11c

Für das Molekül CD11c konnte sowohl auf LC aus normaler Haut als auch auf LC, die aus den Läsionen der verschiedenen Dermatosen isoliert wurden, eine von der Erkrankung weitgehend unabhängige Expression festgestellt werden. CD11c auf LC ist daher kein geeigneter Marker zur Differenzierung verschiedener Diagnosen. Wie auch schon für CD11a und CD11b beschrieben, war die hohe Expression von CD11c für IDEC kennzeichnend. Differentialdiagnostisch eignete sich CD11c auf IDEC für die Abgrenzung des atopischen Ekzems von der Psoriasis und dem nummulären Ekzem. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit, die Psoriasis von der Gruppe KAE signifikant abzugrenzen.

Vergleich der CD11c Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD11c LC	3,39 ±0,61 (n=10)	6,34 ±0,82 (n=26)	4,34 ±0,69 (n=16)	3,70 ±0,61 (n=5)	7,73 ±1,49 (n=7)	5,89 ±4,27 (n=2)	3,36 (n=1)	2,88 ±0,85 (n=3)
CD11c IDEC	n.a.	135,94 ±11,04 (n=27)	52,49 ±7,01 (n=18)	87,64 ±15,41 (n=7)	122,34 ±19,92 (n=7)	84,41 ±35,99 (n=2)	14,77 (n=1)	78,43 ±9,02 (n=4)

Abbildung 23: Auch das $\beta 2$ Integrin CD11c ist in hohem Maße auf IDEC bei entzündlichen Dermatosen zu finden

Bei allen hier untersuchten entzündlichen Hauterkrankungen ist die CD11c Expression auf IDEC (weiße Balken) hoch, während diese Struktur von LC (schwarze Balken) nur schwach exprimiert wird. Die CD11c Expression ist als rFI auf der y-Achse dargestellt.

CD11c LC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,064	0,707	0,951	0,026	0,605	0,913	0,69
AE	0,064		0,078	0,178	0,36	1	0,447	0,153
PSO	0,707	0,078		0,905	0,052	0,734	0,824	0,421
KE	0,951	0,178	0,905		0,074	1	1	0,571
KAE	0,026	0,36	0,052	0,074		0,887	0,253	0,064
LR	0,605	1	0,734	1	0,887		1	1
MF	0,913	0,447	0,824	1	0,253	1		1
Num-E	0,69	0,153	0,421	0,571	0,064	1	1	

CD11c IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,0001	0,072	0,772	0,243	0,072	0,012
PSO	n.a.	0,0001		0,065	0,003	0,376	0,417	0,136
KE	n.a.	0,072	0,065		0,315	0,89	0,248	0,926
KAE	n.a.	0,772	0,003	0,315		0,662	0,253	0,078
LR	n.a.	0,243	0,376	0,89	0,662		0,672	1
MF	n.a.	0,072	0,417	0,248	0,253	0,672		0,398
Num-E	n.a.	0,012	0,136	0,926	0,078	1	0,398	

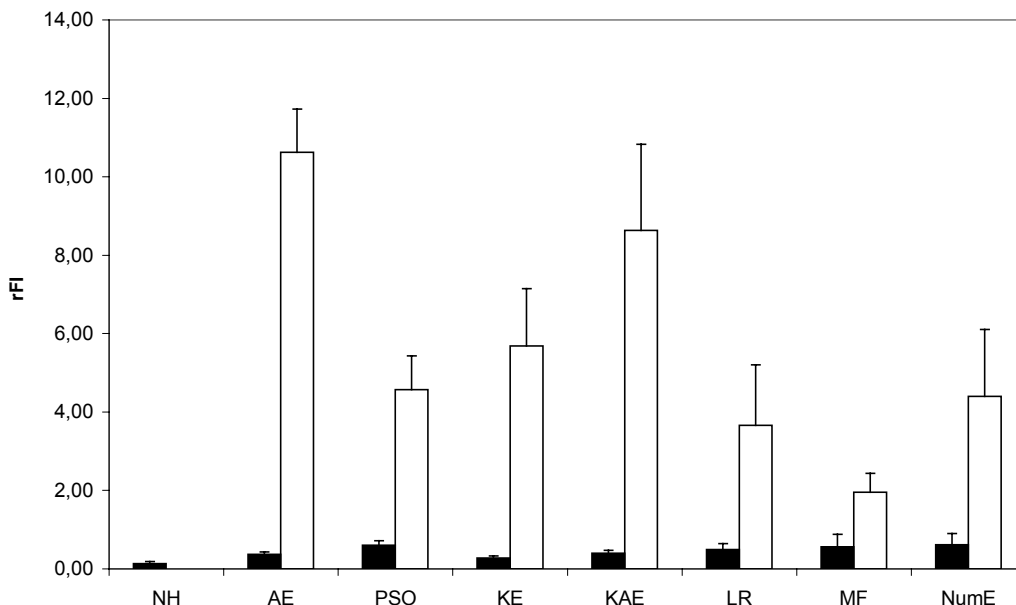
Tabelle 9: CD11c grenzt das AE von der Psoriasis ab

Die hohe Expression von CD11c auf IDEC ist zur signifikanten Abgrenzung des AE von der PSO und NumE geeignet. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit, die PSO von KAE abzugrenzen.

3.4.10 Das Molekül CD1b

CD1b war auf LC nicht exprimiert. Nur IDEC tragen CD1b auf ihrer Zelloberfläche. Die beim atopischen Ekzem höhere CD1b Expression auf IDEC ließ eine statistisch signifikante Abgrenzung des atopischen Ekzems von den anderen untersuchten Diagnosen zu. Eine Ausnahme hiervon stellte wieder die Gruppe KAE dar. Sie war mittels CD1b nicht von der Gruppe des atopischen Ekzems abgrenzbar.

Vergleich der CD1b Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD1b LC	0,14 ±0,05 (n=20)	0,37 ±0,06 (n=47)	0,60 ±0,11 (n=32)	0,27 ±0,06 (n=14)	0,40 ±0,08 (n=14)	0,50 ±0,15 (n=5)	0,56 ±0,32 (n=4)	0,62 ±0,28 (n=6)
CD1b IDEC	0,00 (n=1)	10,63 ±1,10 (n=52)	4,57 ±0,86 (n=34)	5,68 ±1,46 (n=18)	8,63 ±2,20 (n=14)	3,67 ±1,54 (n=5)	1,96 ±0,48 (n=4)	4,40 ±1,71 (n=7)

Abbildung 24: CD1b wird nur von IDEC exprimiert

IDEC aus läSIONALER Haut (weiße Balken) beim atopischen Ekzem (AE) und Kontakt ekzem (KAE) tragen CD1b in hohem Maße auf ihrer Oberfläche. Demgegenüber zeigen LC keine CD1b Expression. Der CD1b rFI ist auf der y-Achse dargestellt.

CD1b IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	NumE
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,0001	0,005	0,234	0,022	0,003	0,02
PSO	n.a.	0,0001		0,25	0,153	0,951	0,341	0,929
KE	n.a.	0,005	0,25		0,402	0,451	0,059	0,535
KAE	n.a.	0,234	0,153	0,402		0,186	0,161	0,283
LR	n.a.	0,022	0,951	0,451	0,186		0,724	0,87
MF	n.a.	0,003	0,341	0,059	0,161	0,724		0,654
NumE	n.a.	0,02	0,929	0,535	0,283	0,87	0,654	

Tabelle 10: CD1b erlaubt die Abgrenzung des atopischen Ekzems von anderen Diagnosen

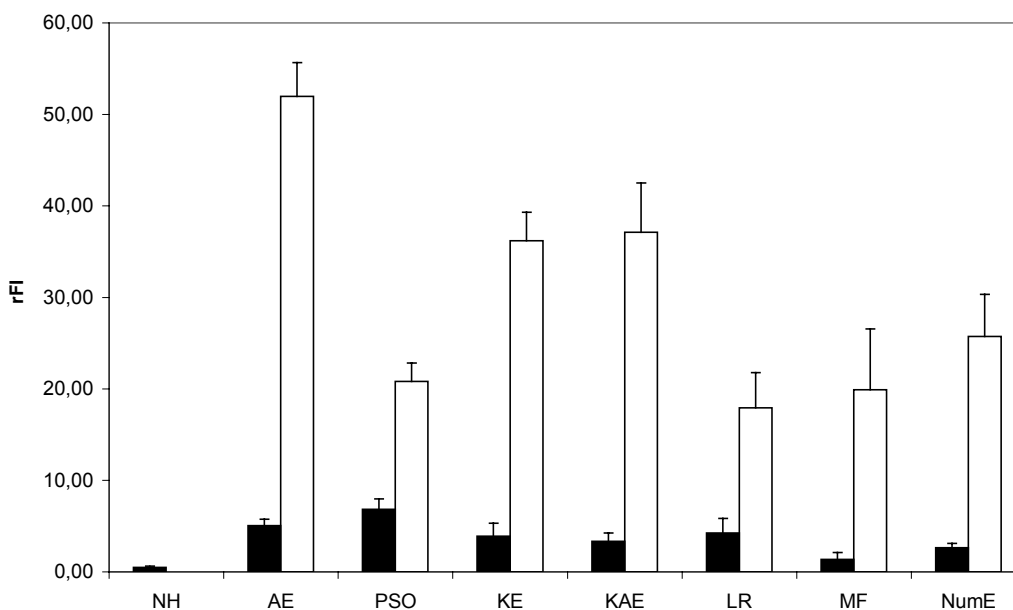
Die CD1b Expression auf IDEC erlaubt eine statistisch signifikante Abgrenzung des AE von allen anderen Diagnosen mit Ausnahme der Gruppe KAE.

3.4.11 Das Molekül CD36

Der Thrombospondin Rezeptor CD36 war auf LC aus normaler Haut nicht exprimiert. Auf LC, die aus entzündlichen Hautläsionen isoliert wurden, war er hingegen mit einer Expressionsstärke von rFI 2 bis 7 vorhanden. CD36 auf LC kann als Entzündungsmarker gesehen werden, der eine eindeutige Abgrenzung normaler Haut von entzündlichen Dermatosen ermöglicht.

IDEC zeigten gegenüber LC eine bis zu zehnfach höhere Oberflächenexpression von CD36. Durch die hohe Expressionsstärke von CD36 auf IDEC beim atopischen Ekzem lässt sich das atopische Ekzem statistisch signifikant von jeder anderen untersuchten Dermatose abgrenzen. Durch die Bestimmung von CD36 ergibt sich die Möglichkeit, normale Haut und atopisches Ekzem von allen anderen Diagnosen zu unterscheiden, so dass mittels anderer Marker nur noch zwischen den verbleibenden Diagnosen unterschieden werden muss.

Vergleich der CD36 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD36 LC	0,50 ± 0,10 (n=23)	5,03 ± 0,70 (n=46)	6,82 ± 1,18 (n=35)	3,90 ± 1,38 (n=14)	3,34 ± 0,90 (n=14)	4,27 ± 1,55 (n=5)	1,37 ± 0,73 (n=4)	2,63 ± 0,51 (n=6)
CD36 LC	0,00 (n=1)	51,99 ± 3,65 (n=51)	20,81 ± 2,04 (n=37)	36,19 ± 3,11 (n=17)	37,14 ± 5,39 (n=14)	17,92 ± 3,87 (n=5)	19,90 ± 6,64 (n=5)	25,72 ± 4,61 (n=7)

Abbildung 25: Das Molekül CD36 ist auf IDEC und auf LC bei allen untersuchten Dermatosen erhöht

Als Zeichen der Entzündung ist sowohl auf LC (schwarze Balken) als auch auf IDEC (weiße Balken) bei allen hier untersuchten Dermatosen die Expression von CD36 gegenüber normaler Haut (NH) erhöht. Die y-Achse zeigt den rFI der CD36 Expression.

CD36 LC		AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,271	0,0001
AE	0,0001		0,385	0,043	0,058	0,638	0,011	0,117
PSO	0,0001	0,385		0,031	0,025	0,505	0,012	0,059
KE	0,0001	0,043	0,031		0,805	0,297	0,392	0,602
KAE	0,0001	0,058	0,025	0,805		0,502	0,279	0,908
LR	0,0001	0,638	0,505	0,297	0,502		0,065	0,426
MF	0,271	0,011	0,012	0,392	0,279	0,065		0,173
Num-E	0,0001	0,117	0,059	0,602	0,908	0,426	0,173	

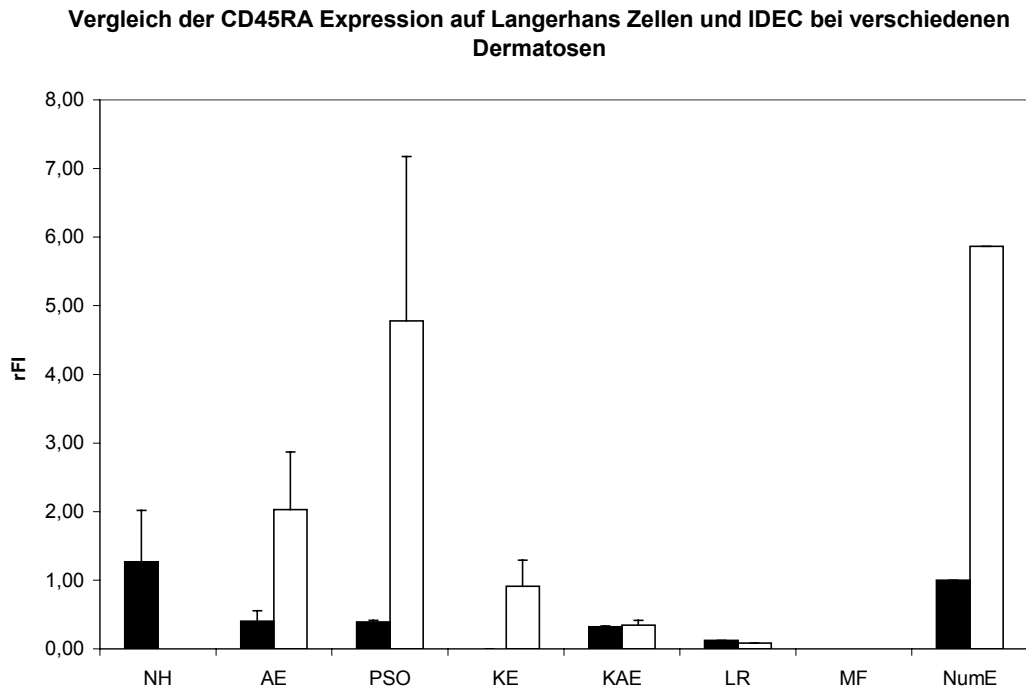
CD36 IDEC		AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AE	n.a.		0,0001	0,006	0,035	0,0001	0,001	0,001
PSO	n.a.	0,0001		0,0001	0,01	0,969	0,733	0,294
KE	n.a.	0,006	0,0001		0,986	0,01	0,039	0,098
KAE	n.a.	0,035	0,01	0,986		0,069	0,16	0,195
LR	n.a.	0,0001	0,969	0,01	0,069		1	0,428
MF	n.a.	0,001	0,733	0,039	0,16	1		0,421
Num-E	n.a.	0,001	0,294	0,098	0,195	0,428	0,421	

Tabelle 11: CD36 grenzt Normale Haut und AE von anderen Diagnosen ab

Im Vergleich mit NH ist CD36 auf LC bei allen von uns untersuchten Diagnosen signifikant höher exprimiert. MF stellt hiervon möglicherweise auch aufgrund der geringen Fallzahl eine Ausnahme dar. Auf IDEC ermöglicht die CD36 Expression eine signifikante Abgrenzung des AE von allen anderen untersuchten Diagnosen.

3.4.12 Das Molekül CD45RA

CD45RA war deutlich stärker auf IDEC als auf LC exprimiert. Aufgrund der relativ geringen Fallzahl war die Differentialdiagnose verschiedener Hauterkrankungen unter Zuhilfenahme dieses Moleküls nicht möglich.



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD45RA LC	1,27 ± 0,75 (n=5)	0,40 ± 0,16 (n=8)	0,39 ± 0,02 (n=3)	0,00 (n=1)	0,32 ± 0,02 (n=2)	0,12 (n=1)	n.a.	1,00 (n=1)
CD45RA IDEC	n.a.	2,03 ± 0,84 (n=8)	4,78 ± 2,40 (n=3)	0,91 ± 0,38 (n=2)	0,34 ± 0,07 (n=2)	0,08 (n=1)	n.a.	5,87 (n=1)

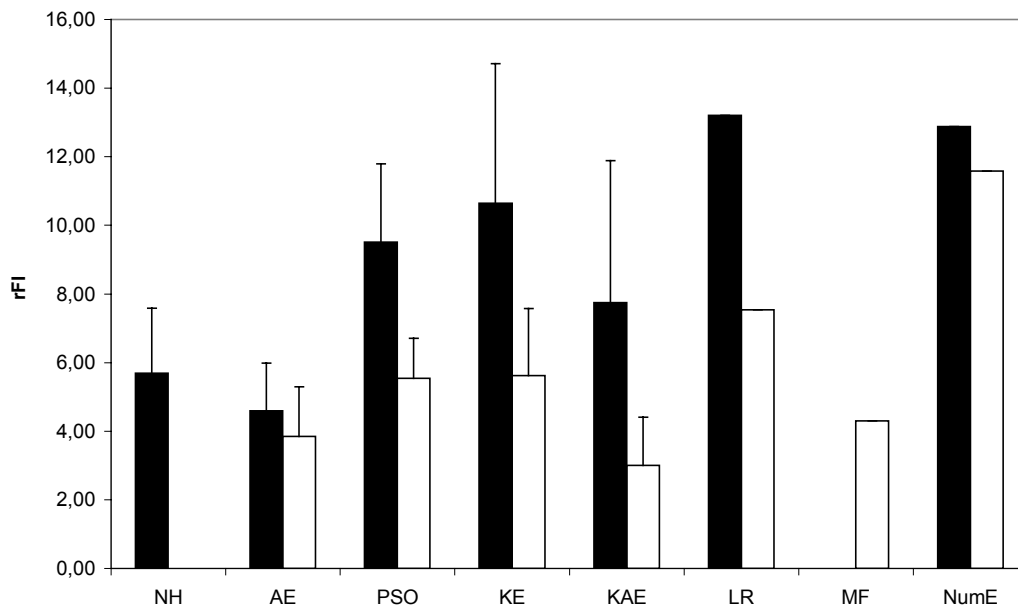
Abbildung 26: Die CD45RA Expression ist auf IDEC höher als auf LC

Die Abgrenzung verschiedener Dermatosen ist durch die Bestimmung der CD45RA Expression auf LC und IDEC nicht möglich. IDEC zeigen höhere Expressionswerte für CD45RA als LC. Die y-Achse zeigt den rFI der CD45RA Expression.

3.4.13 Das Molekül E-Cadherin

E-Cadherin ist das Adhäsionsmolekül, das vor allem für den Zell-zu-Zell Kontakt von Langerhans Zellen und Keratinozyten verantwortlich ist. Bei der Untersuchung verschiedener Dermatosen zeigte sich keine nachweisbare Modulation der Expression in Abhängigkeit von der Diagnose. E-Cadherin war aber neben CD1a bei allen von uns untersuchten Diagnosen das einzige Molekül, das stärker auf LC als auf IDEC exprimiert war.

Vergleich der E-Cadherin Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
E-Cadherin LC	5,69 ± 1,89 (n=6)	4,60 ± 1,39 (n=15)	9,51 ± 2,27 (n=12)	10,65 ± 4,06 (n=4)	7,75 ± 4,14 (n=6)	13,21 (n=1)	n.a.	12,89 (n=1)
E-Cadherin IDEC	n.a.	3,84 ± 1,45 (n=14)	5,54 ± 1,17 (n=11)	5,62 ± 1,95 (n=5)	3,00 ± 1,40 (n=6)	7,54 (n=1)	4,30 (n=1)	11,59 (n=1)

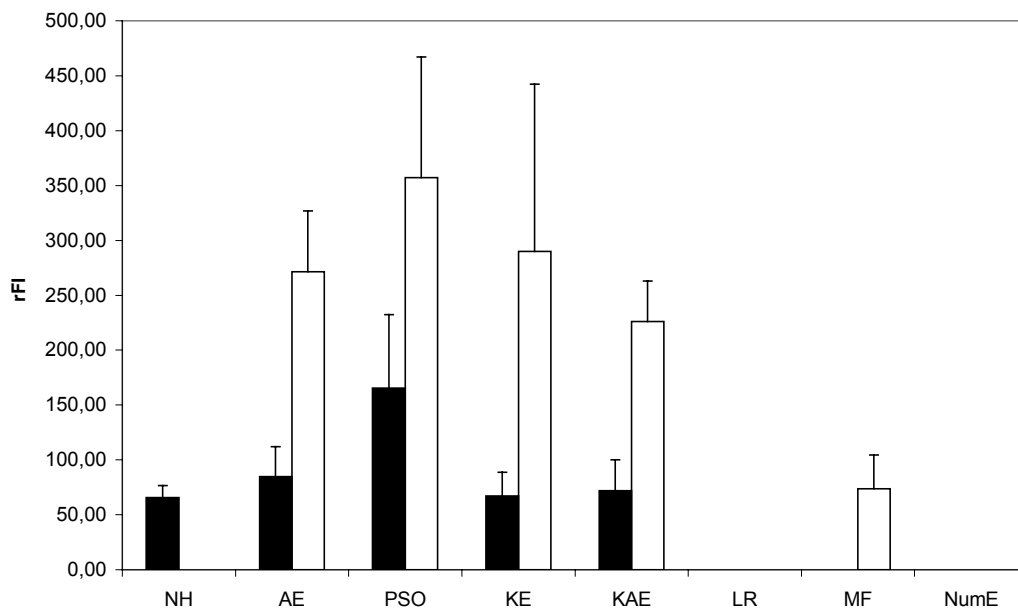
Abbildung 27: E-Cadherin wird sowohl von LC als auch von IDEC in normaler und entzündlicher Haut exprimiert

E-Cadherin, ein Marker epithelialer Zellen, ist auf LC (schwarze Balken) und IDEC (weiße Balken) in normaler Haut (NH) und allen Formen der hier untersuchten entzündlichen Dermatosen exprimiert. Dabei liegt die Oberflächenexpression dieser Struktur auf LC höher als auf IDEC. Der rFI der E-Cadherin Expression ist auf der y-Achse dargestellt

3.4.14 HLA-DR

HLA-DR ist bei allen von uns untersuchten Diagnosen auf LC und IDEC das am stärksten exprimierte Molekül. IDEC zeigen gegenüber LC eine nochmals verstärkte Expression von HLA-DR. Es zeigte sich im Trend, dass auch HLA-DR in einer krankheitsspezifischen Weise reguliert wird. Aufgrund der hohen Schwankungen der HLA-DR Expression innerhalb einer Diagnose sowie der zu geringen Fallzahl war aber eine statistisch signifikante Abgrenzung verschiedener Diagnosen durch die Bestimmung der HLA-DR Expression nicht möglich.

Vergleich der HLA-DR Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	KE bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
HLA-DR LC	65,82 ±10,78 (n=6)	84,70 ±27,30 (n=6)	165,50 ±66,75 (n=3)	67,10 ±21,52 (n=3)	71,91 ±28,31 (n=4)	n.a.	n.a.	n.a.
HLA-DR IDEC	n.a.	271,39 ±55,57 (n=7)	357,14 ±109,91 (n=3)	289,89 ±152,36 (n=2)	226,26 ±36,56 (n=4)	n.a.	73,72 ±30,90 (n=3)	n.a.

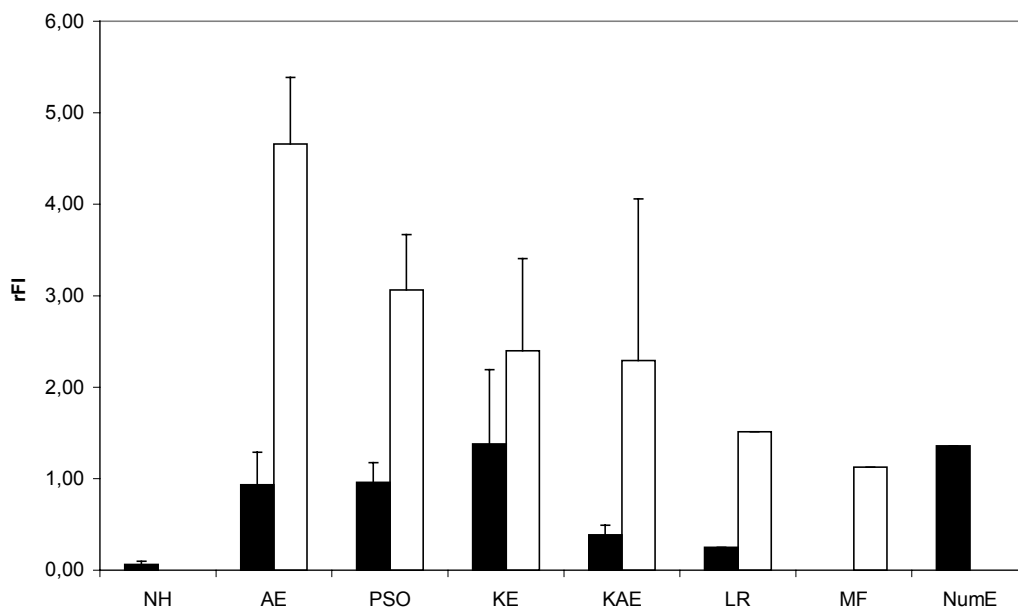
Abbildung 28: HLA-DR wird in verstärktem Maße von IDEC in läSIONALER HAUT exprimiert

Das MHC II Molekül HLA-DR wird im Besonderen von IDEC in läSIONALER HAUT getragen (weiße Balken). Auf LC ist die Oberflächenexpression dieser Struktur im Vergleich mit anderen Molekülen ebenfalls hoch, im Vergleich mit IDEC aber geringer ausgeprägt (schwarze Balken). Der rFI der HLA-DR Oberflächenexpression ist auf der y-Achse aufgetragen.

3.4.15 Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86

Die Daten der CD80(B7-1) und CD86(B7-2) Expression auf LC und IDEC wurden in unserem Labor von E. Schuller et al. erhoben und bereits veröffentlicht[48]. Sie sind hier nochmals dargestellt, da die unter 3.5 beschriebenen diagnostischen Ratios zum Teil auf diesen Daten aufbauen. CD80 und CD86 werden auf dendritischen Zellen vor allem als kostimulatorische Moleküle bei der T-Zell Stimulierung über MHC II benötigt. Wie auch HLA-DR sind CD80 und CD86 auf IDEC stärker exprimiert als auf klassischen LC.

Vergleich der CD80 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen

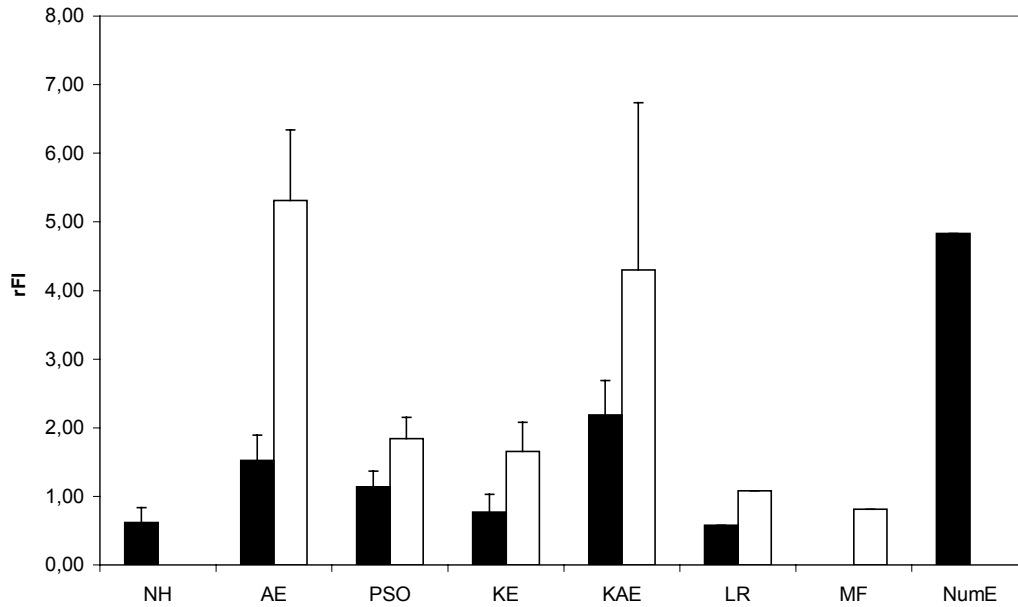


	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	Kontakt Ekzem bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD80 LC	0,06 ± 0,04 SEM (n=9)	0,93 ± 0,35 SEM (n=17)	0,96 ± 0,21 SEM (n=14)	1,38 ± 0,81 SEM (n=4)	0,38 ± 0,11 SEM (n=4)	0,25 (n=1)	n.a.	1,36 (n=1)
CD80 IDEC	n.a.	4,66 ± 0,73 SEM (n=18)	3,06 ± 0,60 SEM (n=12)	2,40 ± 1,01 SEM (n=4)	2,29 ± 1,77 SEM (n=4)	1,51 (n=1)	1,12 (n=1)	n.a.

Abbildung 29: IDEC weisen eine erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 auf

Das kostimulatorische Molekül CD80, welches insbesondere bei der Stimulation von T-Zellen eine Rolle spielt, ist auf IDEC (weiße Balken) gegenüber LC (schwarze Balken) verstärkt zu finden. Auch die Expression dieser Struktur auf LC in lässionaler Haut ist gegenüber normaler Haut (NH) erhöht. Der rFI der CD80 Expression ist auf der y-Achse dargestellt.

Vergleich der CD86 Expression auf Langerhans Zellen und IDEC bei verschiedenen Dermatosen



	Normale Haut	Atop. Ekzem	Psoriasis	Kontakt Ekzem	Kontakt Ekzem bei Atopikern	Lichen ruber	Mykosis fungoides	Nummuläres Ekzem
CD86 LC	0,62 ± 0,22 SEM (n=9)	1,53 ± 0,37 SEM (n=16)	1,14 ± 0,23 SEM (n=14)	0,77 ± 0,26 SEM (n=4)	2,18 ± 0,51 SEM (n=4)	0,58 (n=1)	n.a.	4,83 (n=1)
CD86 IDEC	n.a.	5,31 ± 1,03 SEM (n=17)	1,84 ± 0,31 SEM (n=12)	1,65 ± 0,43 SEM (n=5)	4,30 ± 2,43 SEM (n=4)	1,08 (n=1)	0,81 (n=1)	n.a.

Abbildung 30: Das kostimulatorische Molekül CD86 wird von IDEC höher exprimiert

Ähnlich wie CD80 wird auch CD86 von IDEC (weiße Balken) in verstärktem Maße exprimiert. Insbesondere beim atopischen Ekzem (AE) und Kontaktekzem (KAE) ist dieses Molekül auf IDEC erhöht. Der rFI der CD86 Expression ist auf der y-Achse dargestellt.

3.5 Diagnostische Verfahren

In Teil 3.4 konnte gezeigt werden, dass sich die von uns untersuchten Dermatosen durch ein unterschiedliches Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen auf Langerhans Zellen und IDEC voneinander unterscheiden. Im folgenden sollte geklärt werden, inwieweit es hierdurch möglich ist, eine bestimmte Diagnose von der Grundgesamtheit aller anderen untersuchten Dermatosen positiv abzugrenzen. Als Anforderung an ein solches Verfahren wurde gestellt, dass es mit einer hohen Sensitivität und Spezifität die Erkennung der Diagnose durch Bestimmung des Phänotyps von Langerhans Zellen und IDEC für den jeweiligen Patienten gewährleisten müsse.

Zur Etablierung eines entsprechenden Verfahrens wurde auf die bereits publizierte Erfahrung zurückgegriffen, dass sich bestimmte Oberflächenmoleküle in ihrer Expressionsstärke bei einer gegebenen Diagnose zum Teil gegenläufig verhalten. Werden die Expressionsstärken entsprechender Oberflächenmoleküle zueinander ins Verhältnis gesetzt, so werden die Unterschiede im Phänotyp zwischen den verschiedenen Diagnosen akzentuiert[55]. Es ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass die Abgrenzung verschiedener Diagnosen auch dann gelingen kann, wenn für den jeweiligen Einzelmarker keine signifikante Abgrenzung der Diagnosen möglich war. Eine so gebildete Ratio kann hoch sensitiv und spezifisch mit einer bestimmten Diagnose assoziiert sein.

Es wurde eine systematische Suche nach entsprechenden diagnostischen Ratios, getrennt für Langerhans Zellen und IDEC, durchgeführt. Dabei wurden 571 verschiedene Ratios gebildet und auf ihre Eignung zur Abgrenzung einer bestimmten Diagnose hin untersucht. Die klinische Relevanz eines solchen Verfahrens ist insbesondere für ekzematöse Hauterkrankungen gegeben, da über die Möglichkeiten der klinischen Differentialdiagnose hinaus bisherige labortechnische und histologische Untersuchungen nur sehr begrenzt zur Diagnosefindung beitragen können.

3.5.1 Diagnose des atopischen Ekzems durch FcεRI/CD32

In 3.4.1 konnte gezeigt werden, dass FcεRI beim atopischen Ekzem vor allem auf IDEC besonders stark exprimiert wird. Die Expressionsstärke auf IDEC war beim atopischen Ekzem signifikant höher als bei jeder anderen Diagnose. Bei der Bestimmung der Expressionsstärke von CD32 (FcγRII) auf IDEC war aufgefallen, dass diese für die Psoriasis am höchsten war.

Für die Berechnung von FcεRI/CD32 auf IDEC wurden die Expressionsstärken der beiden Marker für jeweils einen Patienten ermittelt und die Ratio für diesen Patienten gebildet. Die Anzahl der Patienten, bei denen beide Rezeptorexpressionsstärken auf IDEC gemessen worden waren, ist n=155. Die für die verschiedenen Diagnosen ermittelten Durchschnittswerte der Ratio FcεRI/CD32 auf IDEC ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Aufteilung der Patienten auf die tatsächlichen Diagnosen ist unterhalb des Diagramms angegeben.

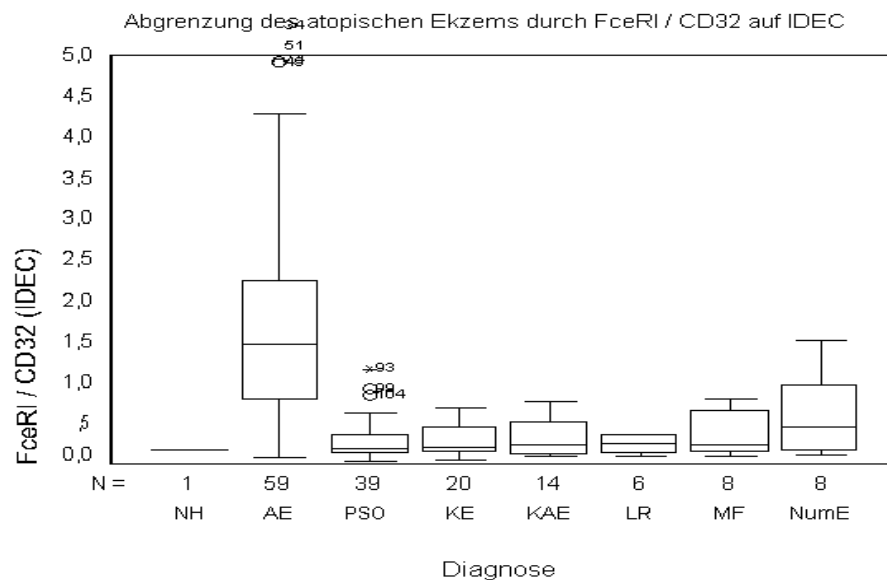
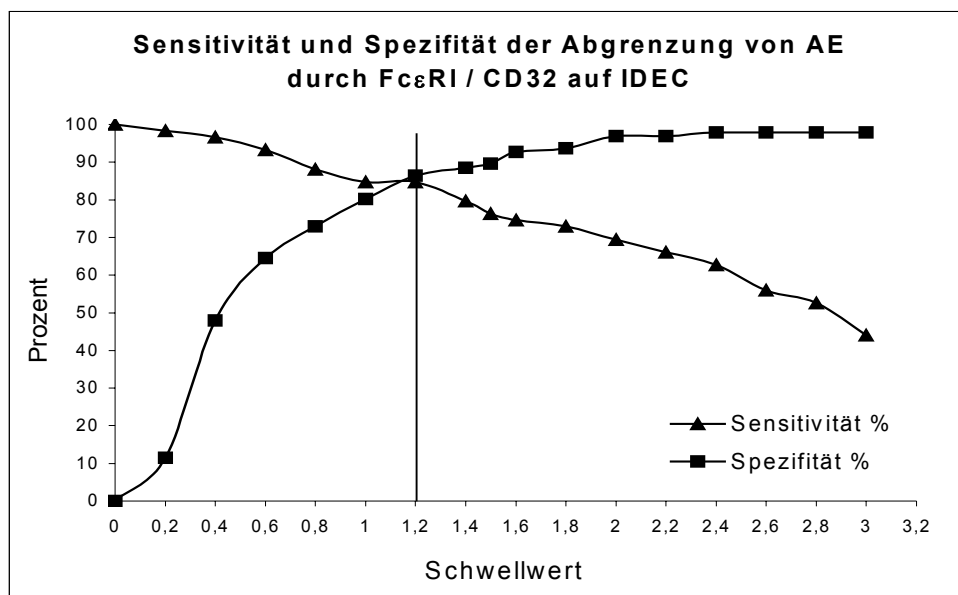


Abbildung 31: Durch die Bildung einer FcεRI/CD32 Ratio auf IDEC lässt sich das AE von anderen Dermatosen abgrenzen

Durch die Bildung einer Ratio aus der FcεRI/CD32 Oberflächenexpression auf IDEC (Zahlenwert der Ratio auf der y-Achse dargestellt) lässt sich das atopische Ekzem (AE) von den anderen untersuchten Dermatosen und normaler Haut (NH) gut abgrenzen.

Zur Abgrenzung des atopischen Ekzems wurde nun nach einem Schwellwert zur Diagnoseabgrenzung gesucht. Dieser Schwellwert sollte die optimale Kombination von Sensitivität und Spezifität für das Verfahren ergeben. Für eine aufsteigende Reihe von möglichen Schwellwerten wurde jeweils die daraus resultierende Sensitivität und Spezifität errechnet und im folgenden Diagramm gegeneinander aufgetragen:



Die optimale Kombination von Sensitivität und Spezifität ergab sich für einen Schwellwert von 1,2:

Schwellwert	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagewert
1,2	84,7	86,5	79,4

Dabei ist die Sensitivität als Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient mit atopischem Ekzem durch das Verfahren auch als solcher erkannt wird, definiert. Die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient, der eine andere Diagnose als atopisches Ekzem hat, durch das Verfahren korrekt als Patient ohne atopisches Ekzem erkannt wird. Die prozentualen Werte für Sensitivität und Spezifität wurden entsprechend der untenstehenden Tabelle mit den dort angegebenen Formeln berechnet.

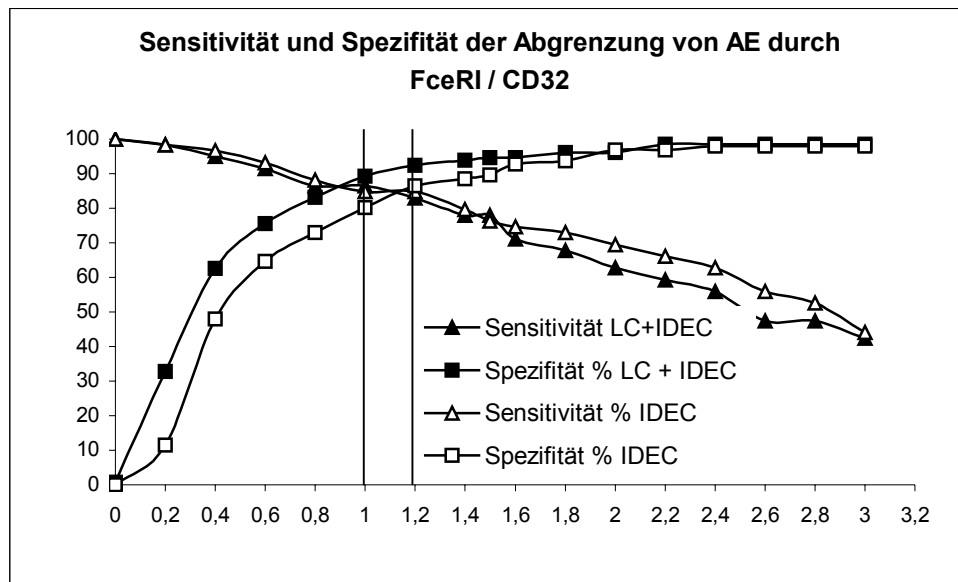
Schwellwert: 1,2		Tatsächliche Situation	
Ermittelte Diagnose	Diagnose	A E	kein A E
	A E	A E	A (Richtig) (50)
Kein A E	Kein A E	C (Fehler 2. Art) (9)	D (Richtig) (83)
		Sensitivität: 84,7% (100% * A)/(A + C)	Spezifität: 86,5% (100% * D)/(B + D)

Der Vorhersagewert (Predictive value) steht für die Wahrscheinlichkeit, dass die durch das Verfahren ermittelte Diagnose zutreffend ist. Sie wurde mit:

Vorhersagewert (atopisches Ekzem) = $100\% * A / (A + B) = 79,4\%$

berechnet.

In einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass die Bestimmung der FcεRI/CD32 Ratio auf allen CD1a positiven epidermalen Zellen ebenfalls zur Diagnose des atopischen Ekzems herangezogen werden kann [55]. Im folgenden wird diese konventionelle Methode zur Bestimmung der FcεRI/CD32 mit der oben beschriebenen FcεRI/CD32 Ratio für IDEC bezüglich Sensitivität und Spezifität der Diagnosefindung verglichen.



Zunächst liegt der Schwellwert, der die optimale Kombination aus Sensitivität und Spezifität ergibt, bezüglich des klassischen Verfahrens mit 1,0 etwas tiefer.

Schwellwert	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagewert
1	86,4	89,3	78,5

Vergleicht man beide Verfahren, unter Verwendung des jeweils optimalen Schwellwertes, so ist das klassische Verfahren sowohl bezüglich der Sensitivität (86,4% vs. 84,7%) als auch bezüglich der Spezifität (89,3% vs. 79,4%) besser zur Diagnosefindung des atopischen Ekzems geeignet.

Bei der klinischen Anwendung eines solchen Verfahrens kann durch Erhöhung des Schwellwertes die Spezifität zuungunsten der Sensitivität erhöht werden. Bei Erhöhung des Schwellwertes nimmt die Sensitivität beider Verfahren im gleichen Maße ab. Das klassische Verfahren zeigt jedoch bei zunehmendem Schwellwert einen rascheren Anstieg der Spezifität. So ergibt sich für einen Schwellwert von 1,5 für beide Verfahren folgende Situation:

Schwellwert	klassisches Verfahren		neues Verfahren	
	Sensitivität LC+IDEC	Spezifität % LC + IDEC	Sensitivität % IDEC	Spezifität % IDEC
1,5	77,97	94,66	76,27	89,58

Für eine möglichst spezifische Abgrenzung des atopischen Ekzems von anderen Diagnosen, bei noch hinreichender Sensitivität, ist somit das klassische Verfahren ebenfalls besser geeignet.

3.5.2 Diagnose der Psoriasis durch CD64/CD11b auf IDEC

Der hochaffine IgG Rezeptor CD64 zeigt bei der Psoriasis eine besonders hohe Expressionsstärke auf IDEC (siehe 3.4.5). CD64 war daher ein Kandidat für die positive Abgrenzung der Psoriasis von anderen Diagnosen. Bei der Suche nach einer entsprechenden Ratio fiel die Wahl des zweiten Moleküls auf CD11b, da dieses bei der Psoriasis im Vergleich zu den häufig auftretenden Diagnosen atopisches Ekzem und Kontaktekzem geringer exprimiert war. Die Anzahl der Patienten, bei denen die Expressionsstärke beider Rezeptoren auf IDEC bestimmt worden war, ist n=38. Für jeden

dieser Patienten wurde die entsprechende Ratio errechnet. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Diagnosen ist unten graphisch dargestellt. Die Anzahl der Patienten pro Diagnose ist wieder unterhalb des Diagramms angegeben.

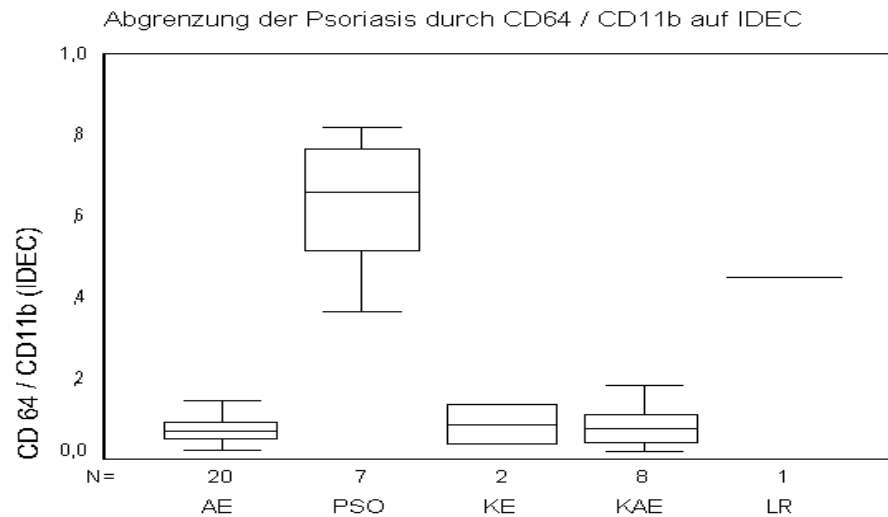
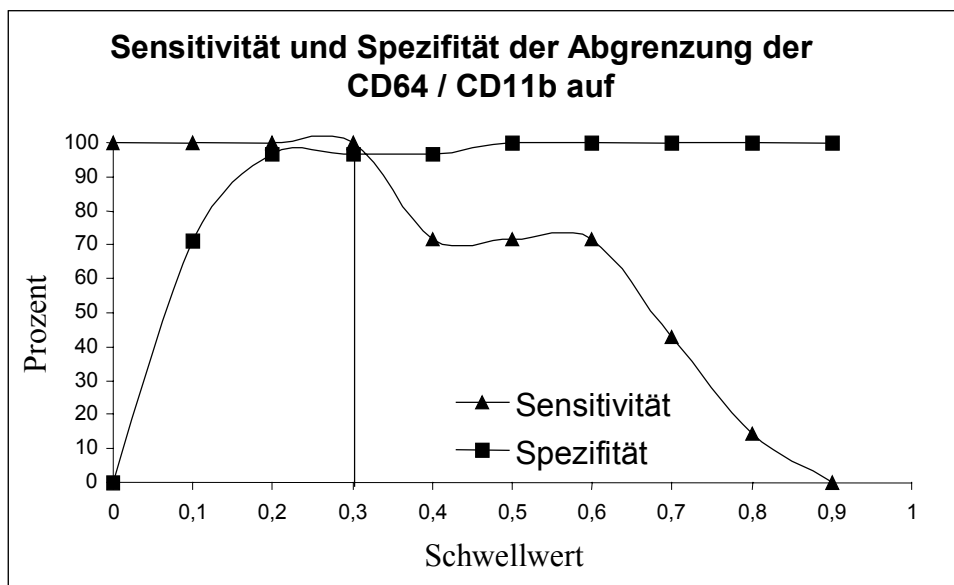


Abbildung 32: Die Ratio aus CD64/CD11b Expression auf IDEC grenzt die Psoriasis von den anderen untersuchten Dermatosen ab

Durch die Bildung einer Ratio aus der CD64/CD11b Expression auf IDEC (Zahlenwert dargestellt auf der y-Achse) lässt sich die Psoriasis (PSO) von anderen entzündlichen Dermatosen abgrenzen.

Es wurde wiederum nach einem geeigneten Schwellwert für die errechnete Ratio gesucht, um eine Abgrenzung der Psoriasis von anderen Diagnosen zu ermöglichen. Zunächst wurden hierfür wieder Sensitivität und Spezifität für die aufsteigende Reihe der Schwellwerte ermittelt und im unten gezeigten Diagramm dargestellt: Der optimale Schwellwert für die Abgrenzung der Psoriasis mittels CD64/CD11b auf IDEC wurde mit 0,3 ermittelt.



Schwellwert	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagewert
0,3	100,0	96,8	87,5

Die Ermittlung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewerts wurde wieder mit der folgenden Tabelle durchgeführt:

Schwellwert: 0,3		Tatsächliche Situation	
Ermittelte Diagnose	Diagnose	Psoriasis	Keine Psoriasis
	Psoriasis	A (Richtig) (7)	B (Fehler 1. Art) (1)
Keine Psoriasis	C (Fehler 2. Art) (0)	D (Richtig) (30)	
		Sensitivität: 100% (100% * A)/(A + C)	Spezifität: 96,8% (100% * D)/(B + D)

3.5.3 Diagnose des Kontaktekzems durch E-Cadherin/B7-2 auf Langerhans Zellen

Die systematische Suche nach diagnostischen Ratios ergab auch eine Möglichkeit, das Kontaktekzem von anderen Diagnosen mit hoher Sensitivität und Spezifität abzugrenzen. Hierzu wird die Expressionsstärke von E-Cadherin auf Langerhans Zellen ins Verhältnis zur Expression von CD86, ebenfalls auf Langerhans Zellen, gesetzt. Wie bereits zuvor beschrieben, ist E-Cadherin neben CD1a das einzige von uns untersuchte Molekül, das auf Langerhans Zellen stärker exprimiert ist als auf IDEC.

Die Anzahl der Patienten, bei denen sowohl E-Cadherin als auch CD86 auf Langerhans Zellen bestimmt worden war, ist n=19.

Der Vergleich zwischen den untersuchten Diagnosen bezüglich der untersuchten Ratio zur Abgrenzung des Kontaktekzems ist im folgenden Diagramm dargestellt:

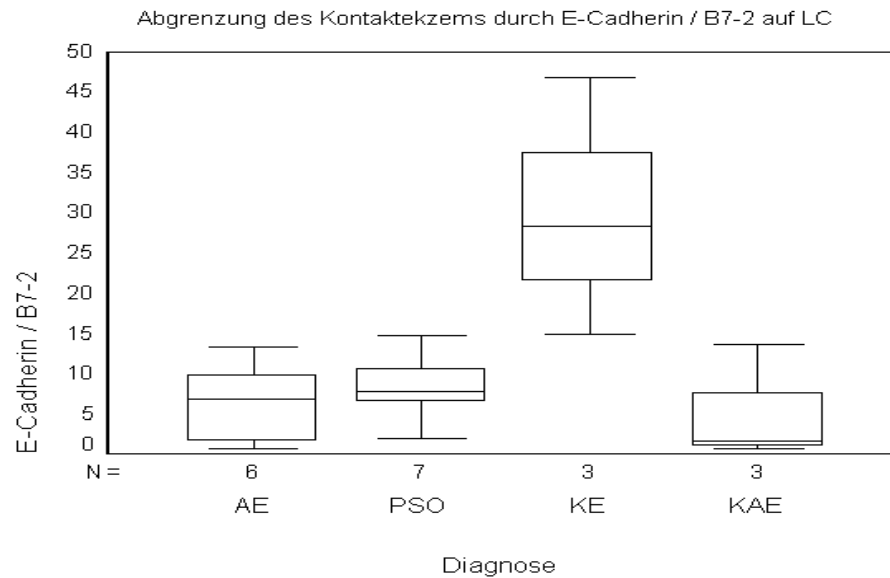
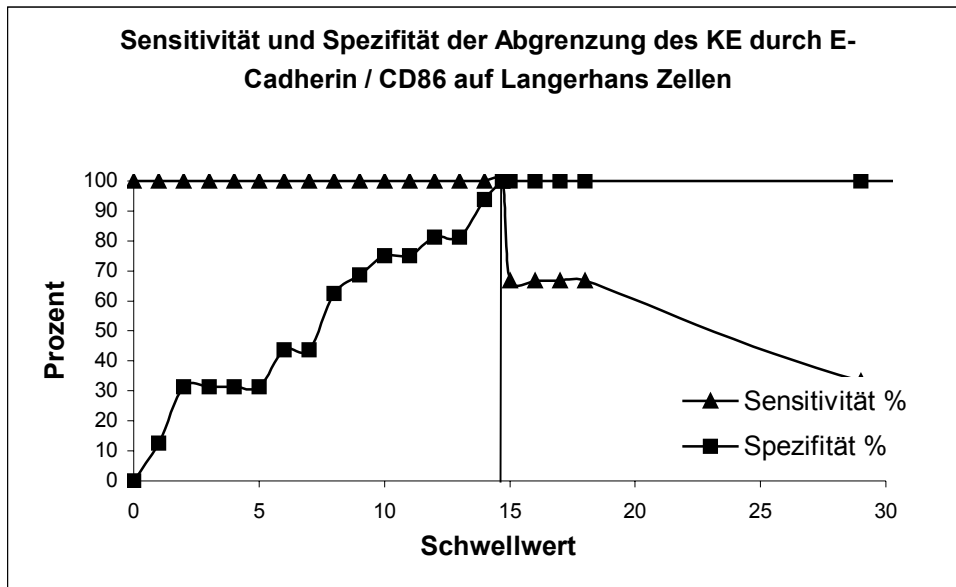


Abbildung 33: Das Kontaktekzem lässt sich anhand einer Ratio aus E-Cadherin/CD86 (B7-2) auf LC spezifizieren

Durch Bildung einer Ratio aus der E-Cadherin/CD86 Expression von LC (Zahlenwert dargestellt auf der y-Achse) lässt sich das Kontaktekzem (KE) von den anderen hier untersuchten Dermatosen unterscheiden.

Zur Festlegung des Schwellwertes, der eine Abgrenzung des Kontaktekzems von anderen Diagnosen ermöglicht, wurden Sensitivität und Spezifität für verschiedene Schwellwerte ermittelt und graphisch dargestellt:



Für die Ratio E-Cadherin/CD86 auf LC ergab sich, dass ein Schwellwert von 14,7 das Optimum an Sensitivität und Spezifität für die Abgrenzung des Kontaktekzems von anderen Diagnosen ist.

Für den Schwellwert 14,7 ergaben sich folgende Werte für die Sensitivität und Spezifität:

Schwellwert	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagewert
14,7	100,0	100,0	100,0

Sie wurden wieder nach der folgenden Tabelle berechnet:

Schwellwert: 14.7		Tatsächliche Situation	
Ermittelte Diagnose	Diagnose	Kontaktekzem	Kein Kontaktekzem
	Kontaktekzem	A (Richtig) (3)	B (Fehler 1. Art) (0)
Kein Kontaktekzem	C (Fehler 2. Art) (0)	D (Richtig) (16)	
		Sensitivität: 100% (100% * A)/(A + C)	Spezifität: 100% (100% * D)/(B + D)

Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität muss bezüglich der Ratio E-Cadherin/CD86 auf LC angemerkt werden, dass die derzeit noch sehr geringen Fallzahlen nur eine eingeschränkte Bewertung der diagnostischen Möglichkeiten dieser Ratio zulassen.

3.5.4 Diagnose des Kontaktekzems bei Atopikern durch E-Cadherin/CD80 auf IDEC

Bei der Bestimmung des Phänotyps von Langerhans Zellen und IDEC war aufgefallen, dass für die Diagnose Kontaktekzem unterschieden werden muss, ob es sich um einen

Patienten mit oder ohne atopischer Diathese handelt. Zur korrekten Diagnosestellung mittels Phänotypisierung ist es daher unerlässlich, genaue klinische Informationen über die Atopieanamnese eines Patienten einzuholen. In Abschnitt 3.4.6 konnte gezeigt werden, dass Langerhans Zellen CD49d bei bestehender Kontaktallergie dann am stärksten exprimieren, wenn zusätzlich eine atopische Diathese hinzukommt. Sind andere Diagnosen ausgeschlossen, so ergibt eine erhöhte Expression von CD49d auf Langerhans Zellen zumindest einen Hinweis auf das Vorliegen einer atopischen Diathese und sollte zu einer erneuten anamnestischen Nachfrage Anlass geben. Bei der Suche nach einer Möglichkeit, die Gruppe KAE dennoch von der Grundgesamtheit aller untersuchten Diagnosen abzugrenzen, stießen wir auf die Ratio E-Cadherin/B7-1 auf IDEC. Im Vergleich der Diagnosen war diese Ratio bei KAE am höchsten. Ein Vergleich der Diagnosen bezüglich dieser Ratios ist im folgenden Diagramm dargestellt:

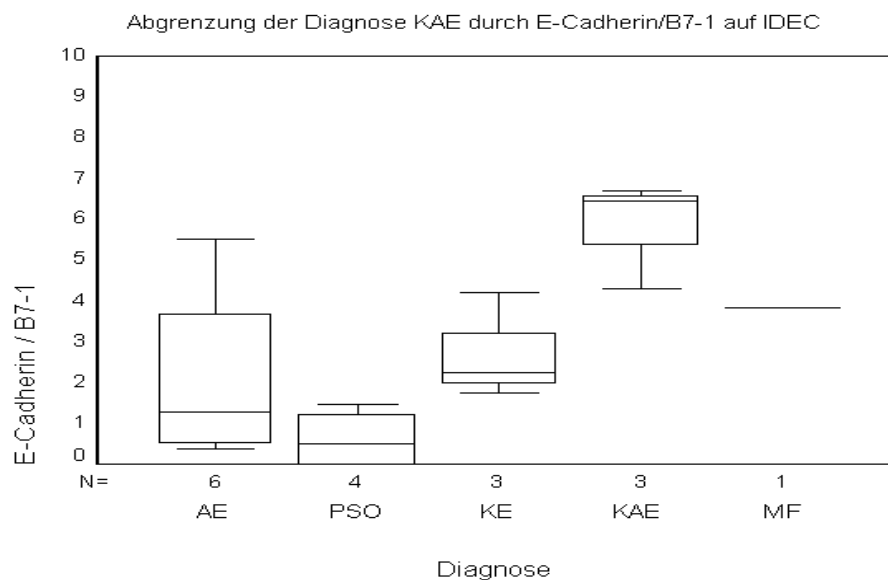
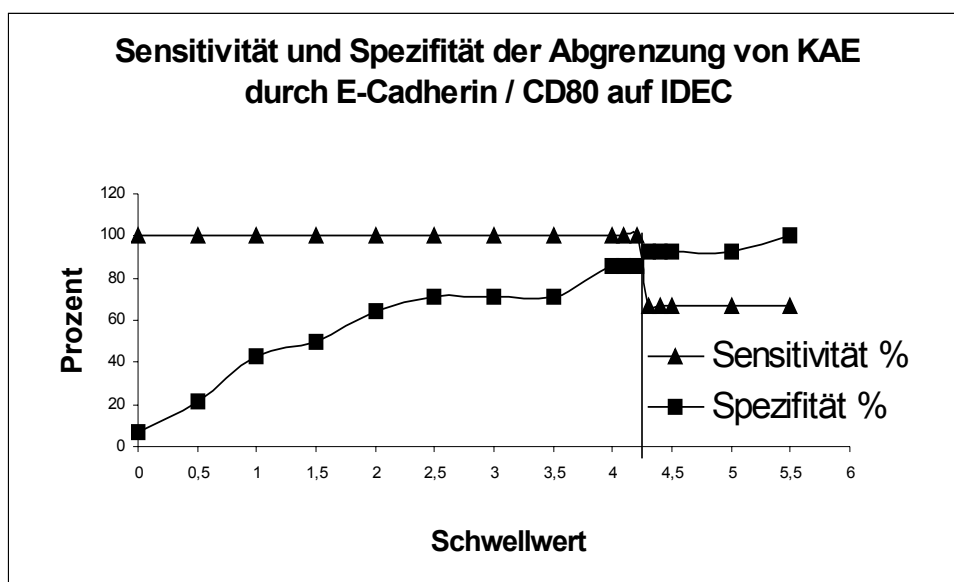


Abbildung 34: Das allergische Kontaktekzem bei atopischer Diathese kann anhand einer Ratio aus E-Cadherin und CD80 auf IDEC abgegrenzt werden

Das KE bei atopischer Diathese (KAE) lässt sich anhand einer Ratio aus der E-Cadherin/CD80 Expression (Zahlenwert dargestellt auf der y-Achse) vom Kontaktekzem (KE) und den anderen Dermatosen unterscheiden.

Die Gesamtzahl der Patienten, für die diese Ratio untersucht wurde, ist n=17. Da diese Ratio zur Diagnose des Kontaktekzems bei Patienten mit atopischer Diathese (KAE) dient, aber in dieser Gruppe die Fallzahl nur n=3 ist, sollten die Daten als erster Hinweis, dass die Diagnose KAE mittels der beschriebenen Ratio gestellt werden kann, gewertet werden.

Wie bereits für alle anderen Ratios, wurden wieder die Sensitivität und Spezifität errechnet, mit der die Ratio E-Cadherin/CD80 auf IDEC die Abgrenzung der Gruppe KAE von allen anderen Diagnosen erlaubt:



Der optimale Schwellwert wurde mit 4,2 ermittelt. Für diesen Schwellwert ergaben sich folgende Werte für die Sensitivität und Spezifität der Methode:

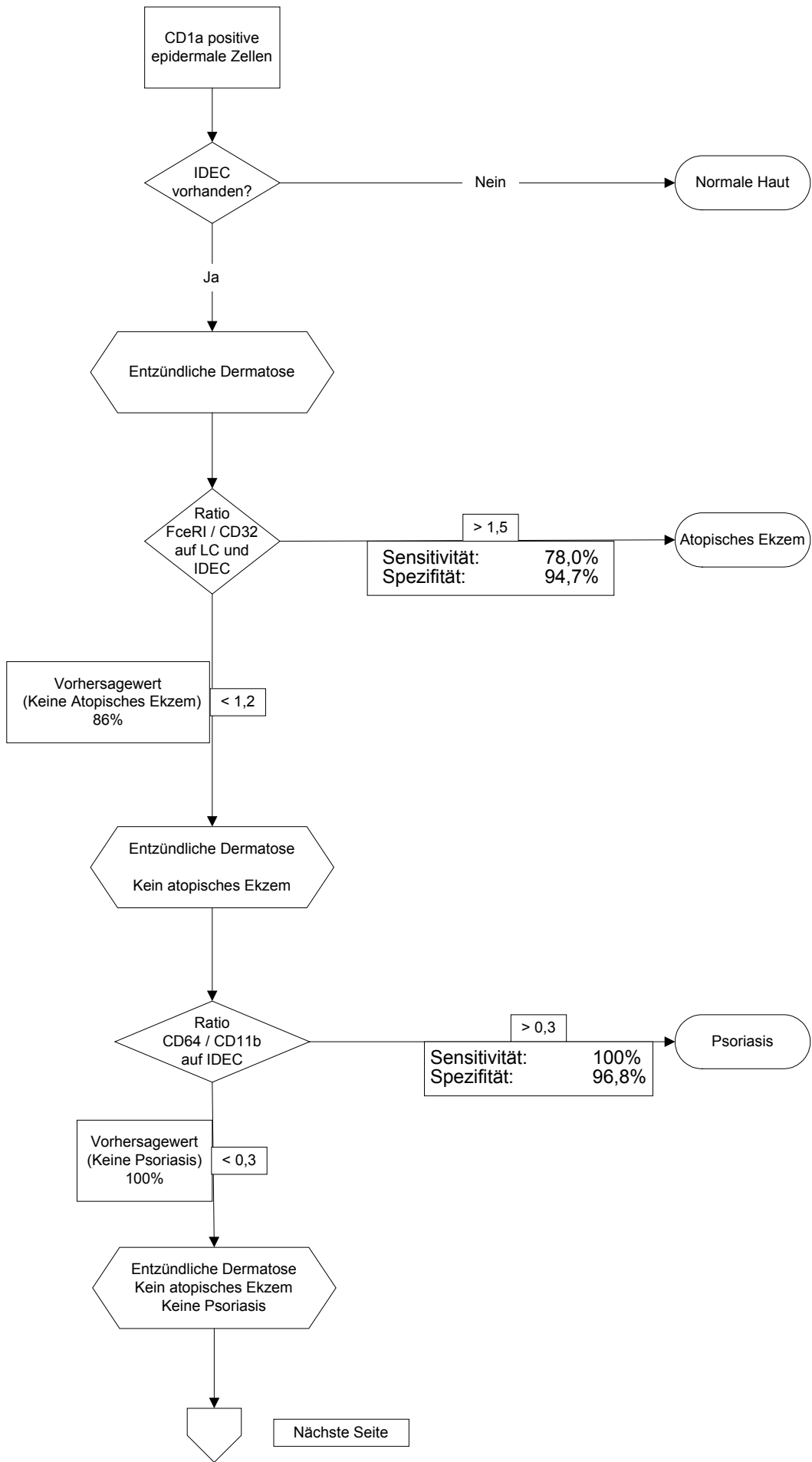
Schwellwert	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagewert
4,2	100,0	85,7	60,0

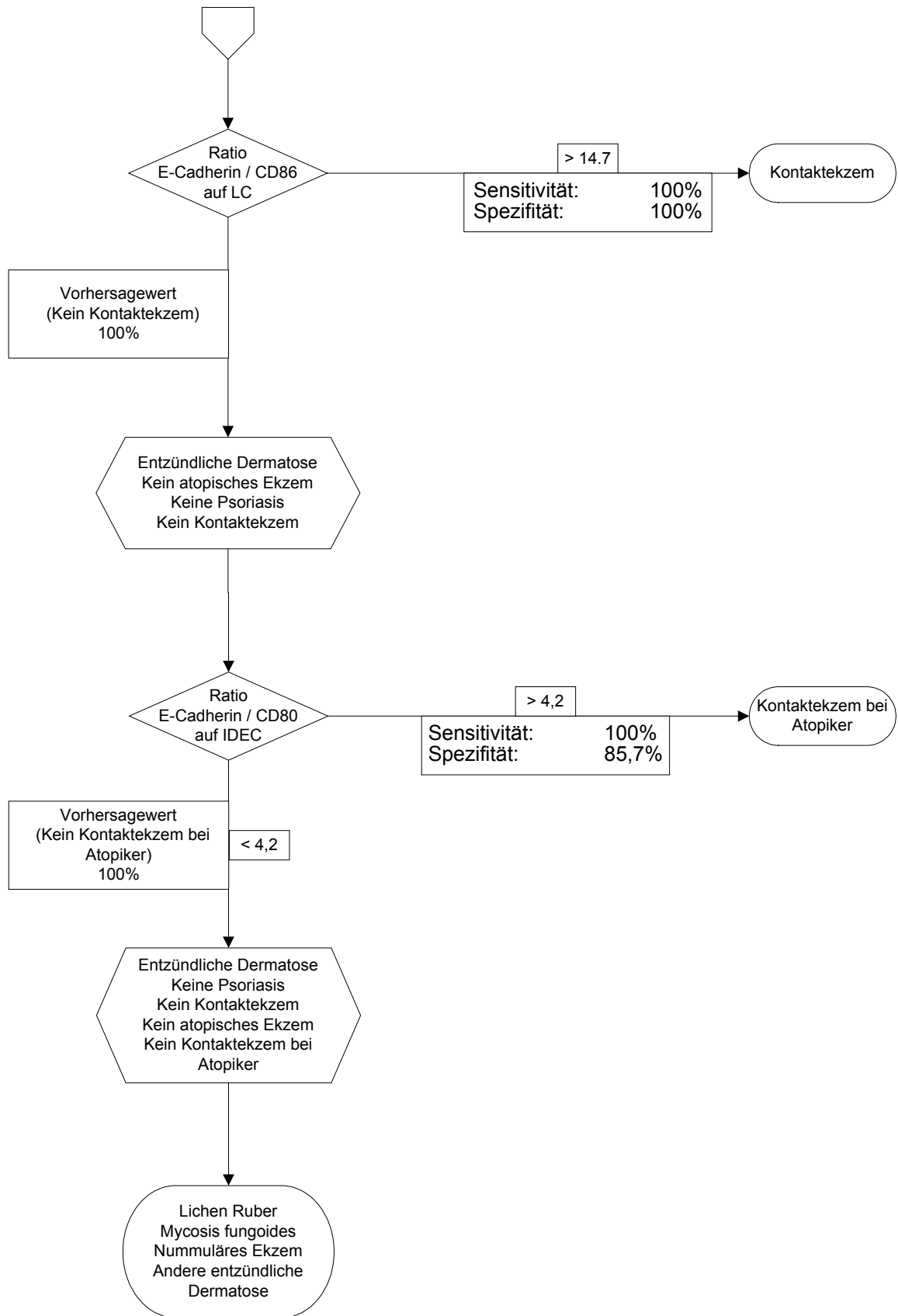
Sie wurden wieder nach der folgenden Vierfeldertafel berechnet:

Schwellwert: 4,2		Tatsächliche Situation	
		KAE	Kein KAE
Ermittelte Diagnose	KAE	A (Richtig) (3)	B (Fehler 1. Art) (2)
	Kein KAE	C (Fehler 2. Art) (0)	D (Richtig) (12)
		Sensitivität: 100 % (100% * A)/(A + C)	Spezifität: 85,7 % (100% * D)/(B + D)

3.5.5 Algorithmus zur Diagnosestellung

Aus den unter 3.5.1 bis 3.5.4 entwickelten Ratios wurde ein Algorithmus aufgestellt, nach dem die positive Identifikation in den meisten Fällen möglich ist. Die Aneinanderreihung der diagnostischen Schritte wurde entsprechend der bisher gemachten Erfahrungen, d.h. der Anzahl der Patienten, bei denen sich die entsprechende Ratio bereits in der Diagnostik bewährt hatte, vorgenommen. Im folgenden ist der Ablauf der Diagnosefindung als Flussdiagramm dargestellt:





3.5.6 Differentialdiagnose von jeweils zwei Dermatosen

Im Abschnitt 3.4 wurde gezeigt, dass die Abgrenzung von jeweils zwei möglichen Diagnosen durch verschiedene Einzelmarker möglich ist. Bestehen nach der Auswertung der Diagnostischen Ratios noch Zweifel an der Diagnose, oder soll mittels Phänotypisierung nur die Differentialdiagnose zwischen zwei möglichen Alternativen ermittelt werden, so kann die Expressionsstärke eines einzelnen Moleküls auf LC oder IDEC zur Beantwortung dieser Frage herangezogen werden. Welche Marker dazu jeweils geeignet sind, ergibt sich aus dem Ergebnis des Mann–Whitney-U-Tests, der für jeden Marker getrennt für Langerhans Zellen und IDEC berechnet wurde. Das Signifikanzniveau, mit dem eine Abgrenzung möglich ist, wurde im Abschnitt 3.4 jeweils in den Tabellen angegeben. Als signifikant wurde dabei angesehen, wenn das Signifikanzniveau $p < 0,05$ war. In der folgenden Kreuztabelle wurden jeweils jene Marker aufgeführt, die eine Abgrenzung zweier Diagnosen mit $p < 0,05$ erlauben. Die zu erwartende Expressionsstärke kann aus den Diagrammen in Abschnitt 3.4 entnommen werden.

3.5.6.1 Kreuztabelle der Moleküle auf LC, die eine signifikante Unterscheidung zweier Diagnosen erlauben ($p < 0,05$)

Marker LZ	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH		FceRI CD1b CD36 CD49b CD49d CD11b CD80 CD86	FceRI CD 1b CD36 CD49b CD49d CD11b CD80		CD1b CD36 CD80 CD86	CD1b CD36	CD49d	CD1b CD36 CD11b
AE	FceRI CD1b CD36 CD49b CD49d CD11b CD80 CD86		FceRI CD32 CD1b CD23 CD11a CD11b	FceRI CD36 CD64 CD49d		FceRI	CD36 CD11a	FceRI CD11a
PSO	FceRI CD 1b CD36 CD49b CD49d CD11b CD80	FceRI CD32 CD1b CD23 CD11a CD11b		FceRI CD1b CD36 CD16 CD49d CD11a CD11b	FceRI CD36 CD16	FceRI	CD36	
KE	CD1b CD36 CD11b	FceRI CD36 CD64 CD49d	FceRI CD1b CD36 CD16 CD49d CD11a CD11b		CD49d			CD11a
KAE	CD36 CD49d CD11b CD11c CD80	FceRI	FceRI CD36 CD16	CD49d				
LR	CD1b CD36	FceRI	FceRI					
MF	CD49d	CD36 CD11a	CD36					
Num-E	CD1b CD36 CD11b	FceRI CD11a		CD11a				

3.5.6.2 Kreuztabelle der Moleküle auf IDEC, die eine signifikante Unterscheidung zweier Diagnosen erlauben ($p < 0,05$)

Marker IDEC	NH	AE	PSO	KE	KAE	LR	MF	Num-E
NH								
AE			FceRI CD1b CD36 CD16 CD64 CD11a CD11b CD11c CD86	FceRI CD1b CD36 CD11b		FceRI CD32 CD1b CD36 CD11b	FceRI CD1b CD36	FceRI CD1b CD36 CD11a CD11b CD11c
PSO		FceRI CD1b CD36 CD16 CD64 CD11a CD11b CD11c CD86		CD32 CD36 CD16 CD11b	CD23 CD36 CD16 CD64 CD11b CD11c	CD32	CD32	
KE		FceRI CD1b CD36 CD11b	CD32 CD36 CD16 CD11b			CD36 CD11b	CD36	FceRI
KAE		FceRI CD36	CD36 CD16 CD64 CD11b CD11c					CD16
LR		FceRI CD32 CD1b CD36 CD11b	CD32	CD36 CD11b				
MF		FceRI CD1b CD36	CD32	CD36				
Num-E		FceRI CD1b CD36 CD11a CD11b CD11c		FceRI	CD16			

4. Diskussion

4.1 IDEC werden krankheitsabhängig in die Epidermis rekrutiert

In dieser Arbeit wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Differentialdiagnose entzündlicher Hauterkrankungen erweitert und verfeinert[52]. Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit konnte die Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen so erweitert werden, dass nun die Möglichkeit besteht, neben dem atopischen Ekzem weitere entzündliche Dermatosen mit Hilfe der Phänotypisierung zu diagnostizieren. Die Differentialdiagnose entzündlicher Dermatosen beruht vor allem auf der klinischen Beurteilung des Hautbefundes, da die klassischen labortechnischen und histologischen Untersuchungsmethoden nur eingeschränkt zur Diagnosefindung bei ekzematösen Dermatosen beitragen. Die Diagnosefindung ist damit in hohem Maß von der Erfahrung des behandelnden Dermatologen abhängig und konnte bisher nur eingeschränkt durch objektive labortechnische Untersuchungen validiert werden. Die Phänotypisierung der CD1a positiven dendritischen Zellen der Epidermis beruht auf der Annahme, dass der Phänotyp epidermaler dendritischer Zellen in krankheitsspezifischer Weise durch das epidermale Mikromilieu geprägt wird[52]. Diese Eigenschaft epidermaler dendritischer Zellen ist vermutlich auf die zentrale immunologische Rolle, die dieser Zelltyp in der Haut spielt, zurückzuführen. Bereits kurz nach der Etablierung dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass die auf immunhistologischen Untersuchungen beruhende und von verschiedenen Autoren vorgenommene Gleichsetzung CD1a positiver Zellen mit den Langerhans Zellen nur in normaler Haut richtig ist. Tatsächlich ergibt sich auch mit der sehr viel genaueren flowzytometrischen Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen, dass in normaler Haut Langerhans Zellen die einzige epidermale Zellpopulation sind, die CD1a exprimieren. Aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der Phänotypisierung gelang mit ihrer Hilfe erstmals der Nachweis, dass bei entzündlichen Dermatosen eine weitere CD1a positive Zellpopulation (IDEC) in die Epidermis

einwandert. In der hier vorgelegten Arbeit wurde der prozentuale Anteil dieser beiden CD1a positiven Zelltypen am gesamten epidermalen Zellpool nach Diagnosen aufgeschlüsselt. Es ergab sich dabei, dass vor allem IDEC für den erhöhten Anteil von CD1a positiven Zellen in entzündlicher Epidermis verantwortlich sind. Sowohl die Anzahl der LC als auch der IDEC variiert dabei in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Dermatose. Der höchste Anteil von IDEC konnte für das atopische Ekzem festgestellt werden.

Neue Untersuchungen belegen, dass die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Keratinozyten in Abhängigkeit von einer zugrundeliegenden Erkrankung variiert[24]. Dabei postulieren die Autoren, dass eben diese krankheitsspezifischen Unterschiede in der Chemokinfreisetzung für die Rekrutierung jeweils bestimmter Leukozytentypen verantwortlich sind. Vestergaard et. al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit atopischem Ekzem der Anteil der Monozyten, die den Chemokinrezeptor CCR4 tragen, im peripheren Blut erhöht ist[51]. CCR4 ist der Rezeptor für das Chemokin TARC. Von diesem wiederum konnten die Autoren zeigen, dass es von Keratinozyten in läsionaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem freigesetzt wird, jedoch nicht von normaler Haut. Derzeit wird angenommen, dass auch IDEC von Monozyten, die durch das Gefäßendothel hindurch in die Läsionen entzündlicher Dermatosen einwandern, abstammen. Auf ihrem Weg in die Epidermis der läsionalen Haut reifen sie dabei, durch bisher nicht bekannte Signale, zu CD1a positiven dendritischen Zellen (IDEC) aus. Das Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit, dass die Einwanderung von IDEC in die Epidermis der läsionalen Haut entzündlicher Dermatosen mit der zugrundeliegenden Krankheit variiert, wird durch die Erkenntnis, dass die Einwanderung spezifischer Leukozytensubklassen ein über Chemokine fein gesteuerter Prozess ist, plausibel gemacht. Das noch fehlende Bindeglied, nach dem in zukünftigen Arbeiten gesucht werden sollte, ist der direkte Nachweis entsprechender Chemokinrezeptoren auf IDEC.

4.2 Die phänotypische Charakterisierung von IDEC

Bereits 1996 war bekannt, dass IDEC in deutlich stärkerem Maß als Langerhans Zellen FcεRI auf ihrer Oberfläche tragen[53]. Die Struktur und Funktion von FcεRI auf Langerhans Zellen war von unserer Arbeitsgruppe bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht worden [6; 13; 26; 28; 31; 32]. Für IDEC postulieren wir eine den LC ähnliche Funktion von FcεRI. Da IDEC bisher nur in geringer Anzahl und auch nur zusammen mit LC und Keratinozyten aus läsionaler Haut isoliert werden konnten, entziehen sie sich bisher einer genaueren funktionellen Charakterisierung. Für den niedrigaffinen IgE Rezeptor konnte nachgewiesen werden, dass dieser nur passiv auf der Zelloberfläche von IDEC angelagert ist[52]. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei IgG Rezeptoren (CD64, CD16, CD32) bei verschiedenen Dermatosen im hohen Maß von IDEC exprimiert werden. Den IgG Rezeptoren wird auf dendritischen Zellen eine Rolle bei der Aufnahme von Antigen-IgG Immunkomplexen zugeschrieben. Langerhans Zellen sind in der Lage, diese Antigen-IgG Immunkomplexe mittels rezeptorvermittelter Endozytose aufzunehmen[18]. Langerhans Zellen können außerdem zwei Formen von löslichen Fcγ-Rezeptoren sezernieren[18]. Diese löslichen Fcγ-Rezeptoren spielen vermutlich eine Rolle im Rahmen eines negativen Feedbacks, da sie die Fähigkeit der Langerhans Zellen, Immunkomplexe aufzunehmen, vermindern[14; 15; 18]. Für dendritische Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass über Fcγ-Rezeptoren vermittelte Signale mitentscheiden, ob gegenüber Tumorantigenen eine Immunantwort induziert wird oder ob Toleranz induziert wird [27]. Die hohe Expression von Fcγ-Rezeptoren auf IDEC lässt vermuten, dass IDEC Immunkomplexe aufnehmen können. Die hier vorgelegte Arbeit gibt erste Hinweise, dass Fcγ-Rezeptor vermittelte immunologische Prozesse ebenso wie die über FcεRI vermittelten Prozesse die biologische Funktion von IDEC kennzeichnen.

In dieser Arbeit konnte Ebenfalls gezeigt werden, dass CD49d, CD11a, CD11b und CD11c von IDEC stark exprimiert werden. Es handelt sich hierbei um die α -Ketten von β 1 Integrinen (CD49d/CD29) bzw. von β 2 Integrinen (CD11a/CD18; CD11b/CD18; CD11c/CD18). Für die β 2 Integrine ist bekannt, dass ihre Expression auf der Oberfläche verschiedener Leukozyten eine Voraussetzung für die Extravasation von Leukozyten in entzündlichem Gewebe ist [49]. Entsprechend der Kaskade, dass Leukozyten zunächst, vermittelt durch Selektine, am Endothel entlang rollen, dann vermittelt durch β 2 Integrine am Endothel haften bleiben, um dieses in einem letzten Schritt dann zu durchwandern, stützt die hohe Expression der β 2 Integrine auf IDEC die Hypothese, dass auch die Vorläuferzellen von IDEC mit Hilfe dieses Mechanismus in entzündlich veränderte Haut einwandern. Diese Hypothese wird desweiteren durch die Expression von CD49d auf IDEC gestützt. CD49d/CD29 (VLA-4) ist der Rezeptor für VCAM-1, das auf aktiviertem Endothel exprimiert wird [35]. Darüber hinaus kann CD49d/CD29 an Fibronectin, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, binden, der auch in der Dermis vorkommt [12]. Die Interaktion mit der extrazellulären Matrix wiederum ist notwendig für die Migration von einwandernden Zellen, aber auch für die Ausreifung von monozytären zu dendritischen Zellen [46]. Verbindet man diese Erkenntnis mit unserer Beobachtung, dass IDEC bei allen von uns untersuchten Dermatosen eine geringere Expression von E-Cadherin aufweisen, so passen diese Erkenntnisse gut zu folgendem Bild: Langerhans Zellen sind die residente CD1a positive dendritische Zellpopulation der Epidermis. Die Vorläufer der IDEC werden hingegen bei der Entstehung einer Entzündung aus dem Blut rasch rekrutiert. IDEC durchwandern mit Hilfe des „Rollings“ und „Stickings“ das Endothel und durchwandern schließlich mit Hilfe von β 1 Integrinen die Dermis in Richtung Epidermis. E-Cadherin ist an der Zell-Zell Adhäsion von LC und Keratinozyten beteiligt. Nach unseren Ergebnissen ist es auf der residenten Population der LC stärker als

auf den einwandernden IDEC exprimiert. Die Hypothese, dass IDEC von Vorläuferzellen, die aus dem Blut in die Entzündung einwandern, abstammen, wird durch Untersuchungen gestützt, die zeigen konnten, dass die Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten nicht nur durch die Zugabe von Zytokincocktails möglich ist, sondern auch indem man Monozyten in vitro durch Endothel wandern lässt [46].

4.3 Die Phänotypisierung von LC und IDEC als Diagnostikum

Das wichtigste Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit ist, dass es möglich war, die Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen so zu erweitern, dass sie mit hoher Sensitivität und Spezifität die Differentialdiagnose verschiedener entzündlicher Dermatosen ermöglicht [52; 55]. Neben der bereits vor dieser Arbeit vorhandenen Möglichkeit, mittels Phänotypisierung Läsionen des atopischen Ekzems von Läsionen anderer Dermatosen durch die Phänotypisierung abzugrenzen, besteht nun die Möglichkeit, auch die Läsionen der Psoriasis, des allergischen Kontaktekzems sowie des allergischen Kontaktekzems bei Patienten mit atopischer Diathese positiv von anderen Diagnosen zu differenzieren. Dafür wurden neue diagnostische Algorithmen entwickelt oder präzisiert. Es war bereits gezeigt worden, dass mittels Phänotypisierung des gesamten CD1a positiven Zellpools das atopische Ekzem von anderen entzündlichen Diagnosen aufgrund der hohen Expression von FcεRI positiv abgegrenzt werden kann [53]. Um die Sensitivität und Spezifität dieses Abgrenzungsverfahrens zu verbessern, wurde die Expression von FcεRI zur Expression von CD32 für alle CD1a positiven Zellen einer Hautprobe ins Verhältnis gesetzt [55]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Aussagekraft dieser Ratio noch verbessern ließ, wenn zur Berechnung der Ratio nur die Expression von FcεRI und CD32 auf IDEC herangezogen wird. Die Annahme, dass dies zu einer Verbesserung führen könnte, gründet auf der Beobachtung, dass IDEC die stärksten FcεRI Expressionswerte beim

atopischen Ekzem aufweisen. Wie in 3.5.1 gezeigt, konnte entgegen unserer Annahme keine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der FcεRI/CD32 Ratio für die Diagnosestellung des atopischen Ekzems durch die Berechnung dieser Ratio nur für IDEC vs. aller CD1a positiver Zellen erreicht werden. Deshalb sollte weiterhin die klassische Methode, wie sie in [55] veröffentlicht ist, verwendet werden. Zusätzliche Informationen können aus der CD1b Expressionsstärke sowie den erhöhten Expressionswerten von CD11b, CD11c sowie CD36 gewonnen werden. Im Gegensatz zu der beschriebenen Ratio lässt sich mit keinem Oberflächenmarker alleine das atopische Ekzem von der Grundgesamtheit aller untersuchten Diagnosen positiv abgrenzen. Betrachtet man allerdings das Muster, das sich aus den Expressionsstärken dieser Moleküle ergibt, so kann dieses Muster, neben dem Majorkriterium der Ratio, als Minorkriterium für ein atopisches Ekzem gewertet werden. Insbesondere bei der Differentialdiagnose zwischen nur zwei möglichen Alternativen können einzelne Moleküle entsprechend der Tabelle 3.5.6.2 zur Diagnosefindung beitragen. In diesem Zusammenhang ist es dann auch wichtig, die vorliegenden klinischen Befunde mit zu bewerten, um das Spektrum der möglichen Diagnosen einzugrenzen.

Läsionen der Psoriasis können mittels einer Ratio auf IDEC aus CD64/CD11b mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 96,8% identifiziert werden. Die hohe Sensitivität des Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass CD64, aber auch die anderen IgG-Rezeptoren auf epidermalen dendritischen Zellen in den Psoriasisläsionen besonders stark exprimiert werden. Biologisch gesehen ist diese hohe Expression von CD64 auf epidermalen dendritischen Zellen in den Läsionen der Psoriasis auf die Prädominanz eines TH1-Zytokinprofils zurückzuführen [40]. Es konnte nachgewiesen werden, dass in den Läsionen der Psoriasis das TH1 Zytokin IFN- γ nachzuweisen ist [30]. Von IFN- γ wiederum ist bekannt, dass es zu einer erhöhten Expression von CD64 auf dendritischen Zellen [20], aber auch auf Mastzellen führt [43]. Neben der Ratio aus CD64/CD11b sowie

der gegenüber anderen Diagnosen erhöhten Expression der IgG-Rezeptoren auf IDEC weist eine relativ niedrige Expression der β 2-Integrine CD11b und CD11c auf IDEC auf das Vorliegen einer Psoriasis hin. Ein weiteres Kriterium, das für eine Psoriasis spricht, ist der verstärkte Nachweis von CD23 auf IDEC. Zwar konnte gezeigt werden, dass CD23 nur passiv auf der Zelloberfläche von epidermalen dendritischen Zellen angelagert wird [52], jedoch konnte in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden, dass diese Anlagerung von CD23 im verstärkten Maße bei der Psoriasis stattfindet. Der zugrundeliegende Mechanismus bleibt aber unklar. Der verstärkte Nachweis von CD23 auf IDEC, die aus den Läsionen der Psoriasis isoliert wurden, kann dennoch als zusätzliches empirisches Kriterium für das Vorliegen einer Psoriasis gewertet werden.

In der vorgelegten Arbeit konnte ein Verfahren zur Diagnose des Kontaktekzems entwickelt werden. Es handelt sich dabei um eine Ratio aus E-Cadherin und CD86 Expression auf Langerhans Zellen. Mit Hilfe dieser Ratio ließ sich, bezogen auf die 19 analysierten Datensätze, für die Diagnosestellung des Kontaktekzems eine Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 100% ermitteln. Wegen der geringen Fallzahl müssen diese hohen Werte für Sensitivität und Spezifität allerdings an einer größeren Patientenzahl bestätigt werden. Ein weiteres Kriterium für ein Kontaktekzem ist die auffallend geringe CD49d Expression auf Langerhans Zellen. Insbesondere bei der Abgrenzung des Kontaktekzems vom atopischem Ekzem ergibt sich hierdurch eine signifikante Unterscheidungsmöglichkeit dieser beiden Diagnosen. Die Daten der letzten Ratio aus E-Cadherin/CD80 auf IDEC machten es möglich, die Gruppe der Patienten, die ein Kontaktekzem vor dem Hintergrund einer atopischen Diathese hatten, zu diagnostizieren. Zwar waren die Sensitivität mit 100% und die Spezifität mit 85,7% hoch, jedoch sind die bisher erreichten Fallzahlen ebenfalls noch nicht hinreichend. Auch dieses Verfahren wird in Zukunft überprüft werden.

Neben der Diagnosestellung ermöglicht die Phänotypisierung auch die Quantifizierung des Erfolges therapeutischer Verfahren. Dieser Ansatz wurde bereits bei der Untersuchung der Wirksamkeit einer topischen Therapie des atopischen Ekzems mit dem neuen immunsuppressiven Makrolid FK-506 (Tacrolimus) erfolgreich angewendet [54]. Besonders im Rahmen von Studien bietet sich die Phänotypisierung als objektives und quantitatives Verfahren an. Voraussetzung hierfür ist die Bestimmung jener Oberflächenmoleküle auf Langerhans Zellen und IDEC, die für eine bestimmte Dermatose ein spezifisches Expressionsmuster zeigen. In dieser Arbeit konnte das Muster für normale Haut und das atopische Ekzem verfeinert und für die Psoriasis etabliert werden. Für alle übrigen untersuchten Diagnosen konnte zwar eine krankheitsabhängige Variation der untersuchten Moleküle auf Langerhans Zellen und IDEC gezeigt werden, aufgrund der geringen Fallzahl konnte aber kein charakteristisches Muster identifiziert werden.

4.4 Ausblick

Anhand der hier gewonnenen Daten ließ sich das Verfahren der Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen verbessern. Es ist mit Hilfe dieses standardisierten Verfahrens möglich, in Ergänzung zur klassischen histologischen und laborchemischen Diagnostik ekzematöse Hauterkrankungen zu differenzieren. Anhand eines definierten Panels an Oberflächenmarkern und der Erstellung einer Ratio aus den Expressionsstärken festgelegter Oberflächenmarker auf CD1a+ Zellen kann man insbesondere das atopische Ekzem, das Kontaktekzem sowie die Psoriasis identifizieren. Die Schwierigkeit des Verfahrens liegt zum einen darin, dass eine diagnostische Zuordnung nur bei Entnahme der zu analysierenden Shave-Biopsie aus einem nicht mit Steroiden behandelten Areal möglich ist, zum anderen müssen Entnahme der Shave-Biopsie, Aufarbeitung der Probe

und Analyse der Oberflächenmarker und Auswertung standardisiert ablaufen. Die Weiterentwicklung der Phänotypisierung durch Einbeziehung neuer Oberflächenmarker sollte es in Zukunft möglich machen, auch jene Dermatosen zu differenzieren, die mit den bisherigen Molekülexpressionsmustern noch nicht voneinander abgrenzbar waren.

5. Zusammenfassung

Die Differentialdiagnose entzündlicher Hauterkrankungen setzt seitens des Dermatologen ein hohes Maß an klinischer Erfahrung voraus. Labortechnische und histologische Untersuchungsverfahren sind dabei nur eingeschränkt hilfreich. Ausgehend von der Annahme, dass erstens das atopische Ekzem ein krankheitsspezifisches Mikromilieu in der Epidermis und Dermis aufweist und dass sich zweitens dieses spezifische Mikromilieu im Phänotyp der immunkompetenten CD1a positiven epidermalen dendritischen Zellpopulation widerspiegelt, wurde seit 1995 ein Verfahren zur Immunphänotypisierung von Langerhans Zellen und IDEC entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass das atopische Ekzem durch eine hohe Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI) bei niedriger Expression des IgG-Rezeptors FcγRII auf den dendritischen Zellen der Epidermis hoch sensitiv und spezifisch von anderen Dermatosen abgegrenzt werden kann.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die standardisierte Phänotypisierung CD1a positiver epidermaler Zellen so zu erweitern, dass neben dem atopischen Ekzem auch die Diagnose anderer entzündlicher Hauterkrankungen möglich wird.

Es wurden 296 Patienten mittels standardisierter Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen untersucht. Bei 192 Patienten konnte nach Abschluss aller klinisch diagnostischen Untersuchungen eine eindeutige Diagnose gestellt werden, so dass die an diesen Patienten erhobenen Phänotypisierungsdaten für die Analyse krankheitsspezifischer Veränderungen im Oberflächenmarkerprofil von Langerhans Zellen und IDEC herangezogen wurden. Die Patienten verteilten sich auf 8 Gruppen: Normale Haut (n=31); Atopisches Ekzem (n=59); Psoriasis (n=41); Allergisches Kontaktekzem (n=23); Kontaktekzem bei atopischer Diathese (n=14); Lichen ruber (n=6); Mycosis fungoides (n=10) und Nummuläres Ekzem (n=8).

Es konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil epidermaler dendritischer Zellen in Abhängigkeit von der Diagnose variiert und dass die bei allen entzündlichen Dermatosen nachweisbare Vermehrung epidermaler dendritischer Zellen vorrangig auf eine de novo Einwanderung von IDEC in die Epidermis zurückzuführen ist. Das wesentliche Ergebnis der vorgelegten Arbeit ist die Erweiterung der diagnostischen Phänotypisierung auf die Psoriasis und das allergische Kontaktekzem. So konnte die Psoriasis durch eine Ratio von CD64/CD11b auf IDEC sinnvoll abgegrenzt werden. Das Kontaktekzem war mittels einer Ratio aus E-Cadherin/CD86 auf Langerhans Zellen zu identifizieren. Die Gruppe der Patienten mit Kontaktekzem bei atopischer Diathese wurde durch die Ratio E-Cadherin/CD80 auf IDEC erkannt.

Die bereits für das atopische Ekzem publizierte Ratio FcεRI/CD32 auf allen CD1a positiven Zellen wurde mit der gleichen Ratio, ermittelt nur für IDEC, verglichen. Eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität für die Diagnosestellung des atopischen Ekzems konnte hierdurch nicht erreicht werden.

Die starke Expression von FcεRI auf LC und IDEC kennzeichnet das atopische Ekzem. Typisch für das atopische Ekzem ist weiterhin die Expression von CD36 auf LC und IDEC. Die Psoriasis ist durch eine besonders starke Expression der Fcγ-Rezeptoren auf IDEC gekennzeichnet. Darüber hinaus findet sich eine erhöhte passive Anlagerung von sCD23 an IDEC bei Psoriasis. Gegenüber anderen Diagnosen ist die Expression von CD11b und CD11c auf IDEC vermindert. Für das Kontaktekzem ist die im Vergleich mit anderen entzündlichen Dermatosen niedrige CD49d Expression auf LC kennzeichnend.

Die Einführung neuer diagnostischer Algorithmen in die Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen konnte das diagnostische Spektrum dieser Methode deutlich erweitern. Neben atopischem Ekzem und normaler Haut wurden auch Algorithmen für die Psoriasis und das allergische Kontaktekzem beschrieben. Die systematische Analyse weiterer Dermatosen mit epidermaler Beteiligung dürfte auch für diese Erkrankungen

diagnostische Algorithmen aufzeigen, die das Mikromilieu der entsprechenden Krankheiten widerspiegeln.

Die Phänotypisierung epidermaler dendritischer Zellen dürfte insbesondere im Rahmen klinisch-therapeutischer Studien vermehrt zur Anwendung kommen, da mit dieser Methode eine objektive, quantitative Untersuchung einzelner behandelter oder unbehandelter Hautareale im zeitlichen Verlauf möglich ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Beckman EM, Melian A, Behar SM, Sieling PA, Chatterjee D, Furlong ST, Matsumoto R, Rosat JP, Modlin RL, Porcelli SA (1996) CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells. Evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J Immunol* 157: 2795-2803
2. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB (1994) Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372: 691-694
3. Bevilacqua MP (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767-804
4. Bieber T (1991) Are resident Langerhans cells 'activated' precursors of lymphoid dendritic cells? *Br J Dermatol* 125: 401
5. Bieber T (1992) Fc epsilon RII/CD23 on epidermal Langerhans' cells. *Res Immunol* 143: 445-447
6. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 175: 1285-1290
7. Bieber T, Jurgens M, Wollenberg A, Sander E, Hanau D, de la Salle H (1995) Characterization of the protein tyrosine phosphatase CD45 on human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 25: 317-321

8. Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD (1961) An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51-64
9. Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Graber P, Aubry JP, Jeannin P, Plater-Zyberk C (1997) Structure and functions of CD23. *Int Rev Immunol* 16: 113-128
10. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML (1987) The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 88: 569-573
11. Cotran RS, Mayadas-Norton T (1998) Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris)* 46: 164-170
12. D'Amico G, Bianchi G, Bernasconi S, Bersani L, Piemonti L, Sozzani S, Mantovani A, Allavena P (1998) Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 92: 207-14
13. De la Salle H, Haegel-Kronenberger H, Bausinger H, Astier A, Cazenave JP, Fridman WH, Sautes C, Teillaud JL, Hanau D, Bieber T (1997) Functions of Fc receptors on human dendritic Langerhans cells. *Int Rev Immunol* 16: 187-203
14. De la Salle C, Esposito-Farese ME, Bieber T, Moncuit J, Morales M, Wollenberg A, De la Salle H, Fridman WH, Cazenave JP, Teillaud JL (1992) Release of soluble Fc gamma RII/CD32 molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? *J Invest Dermatol* 99: 15S-17S

15. De la Salle H, Haegel-Kronenberger H, Bausinger H, Astier A, Cazenave JP, Fridman WH, Sautes C, Teillaud JL, Hanau D, Bieber T (1997) Functions of Fc receptors on human dendritic Langerhans cells. *Int Rev Immunol* 16: 187-203
16. Dijkstra HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG (2001) Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol* 22: 510-516
17. Elder JT, Reynolds NJ, Cooper KD, Griffiths CE, Hardas BD, Bleicher PA (1993) CD1 gene expression in human skin. *J Dermatol Sci* 6: 206-213
18. Esposito-Farese ME, Sautes C, de la Salle H, Latour S, Bieber T, de la Salle C, Ohlmann P, Fridman WH, Cazenave JP, Teillaud JL, et al (1995) Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J Immunol* 155: 1725-1736
19. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 186: 109-120
20. Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano RF, Pfefferkorn LC, Guyre PM (1997) Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J Immunol* 158: 3090-3098
21. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: 785-791

22. Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio C, Edelson R (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 2541-2544
23. Gerlini G, Hefti HP, Kleinhans M, Nickoloff BJ, Burg G, Nestle FO (2001) CD1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* 117: 576-582
24. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pita O, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G, Pastore S (2001) Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 107: 871-877
25. Ishii K, Green KJ (2001) Cadherin function: breaking the barrier. *Curr Biol* 11: R569-R572
26. Jürgens M, Wollenberg A, Hanau D, de la Salle H, Bieber T (1995) Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc epsilon RI. *J Immunol* 155: 5184-5189
27. Kalergis AM, Ravetch JV (2002) Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Exp Med* 195: 1653-1659
28. Katoh N, Kraft S, Wessendorf JH, Bieber T (2000) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest* 105: 183-190
29. Kinet JP (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17:931-72

30. Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M (2002) In situ localization of IFN-gamma-positive cells in psoriatic lesional epidermis. *Eur J Dermatol* 12: 20-23
31. Kraft S, Bieber T (2001) Fc epsilon RI-mediated activation of transcription factors in antigen-presenting cells. *Int Arch Allergy Immunol* 125: 9-15
32. Kraft S, Katoh N, Novak N, Koch S, Bieber T (2001) Unexpected functions of Fc epsilon RI on antigen-presenting cells. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 35-37
33. Kraft S, Wessendorf JH, Hanau D, Bieber T (1998) Regulation of the high affinity receptor for IgE on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 161: 1000-1006
34. Lennon-Dumenil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudriere-Gesbert C (2002) A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 14: 15-21
35. Lobb RR, Hemler ME (1994) The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 94: 1722-1728
36. Maher JK, Kronenberg M (1997) The role of CD1 molecules in immune responses to infection. *Curr Opin Immunol* 9: 456-461
37. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Ebner C, Petzelbauer P, Shi GP, Chapman HA, Stingl G (1998) Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a Cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation. *J Immunol* 161: 2731-2739
38. McFarland BJ, Beeson C (2002) Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Med Res Rev* 22: 168-203

39. Moody DB (2001) Polyisoprenyl glycolipids as targets of CD1-mediated T cell responses. *Cell Mol Life Sci* 58: 1461-1474
40. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ (1994) Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94: 202-209
41. Novak N, Haberstick J, Geiger E, Bieber T (1999) Dendritic cells in allergy. *Allergy* 54: 792-803
42. Novak N, Kraft S, Bieber T (2001) IgE receptors. *Curr Opin Immunol* 13: 721-726
43. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD (2000) Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* 164: 4332-4339
44. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA (1989) Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8- cytolytic T lymphocytes. *Nature* 341: 447-450
45. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB (1992) CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 360: 593-597
46. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282: 480-483
47. Ravetch JV, Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-90.: 275-290

48. Schuller E, Teichmann B, Haberstok J, Moderer M, Bieber T, Wollenberg A (2001) In situ expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 293: 448-454
49. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314
50. Torresani C, Manara GC, Ferrari C, De Panfilis G (1991) Immunoelectron microscopic characterization of a subpopulation of freshly isolated epidermal Langerhans cells that reacts with anti-CD23 monoclonal antibody. *Br J Dermatol* 124: 533-537
51. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG (2000) A TH2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 115: 640-646
52. Wollenberg A, Haberstok J, Teichmann B, Wen SP, Bieber T (1998) Demonstration of the low-affinity ige receptor Fc epsilonR2/CD23 in psoriatic epidermis: inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) but not Langerhans cells are the relevant CD1a-positive cell population. *Arch Dermatol Res* 290: 517-521
53. 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: 446-453
54. Wollenberg A, Sharma S, Von Bubnoff D, Geiger E, Haberstok J, Bieber T (2001) Topical tacrolimus (FK506) leads to profound phenotypic and functional alterations

of epidermal antigen-presenting dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 107: 519-525

55. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1995) Langerhans cell phenotyping: a new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases [letter]. *Lancet* 346: 1626-1627
56. Wollenberg A, Wen S, Bieber T (1999) Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37: 147-155

7. Anhang

7.1 Medien und Pufferlösungen

7.1.1 Waschmedium (WM)

Grundmedium: RPMI 1640-Medium (Nr. F1215, Seromed) 500 ml

Zu dem Ausgangsmedium wird über einen 0,2µm Sterilfilter hinzugegeben:

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

7.1.2 FACS Puffer (10-fach)

zu 375 ml bidestilliertem Wasser wird dazu gegeben:

NaCl (Ref. 6400 Merck) 42,5 g

Na₂HPO₄ (Ref. 6586, Merck) 5,35 g

NaH₂PO₄xH₂O (Ref. 6346 Merck) 2,24 g

Nach Auflösen unter ständigem Rühren wird dies zur Lösung hinzugefügt:

Inaktiviertes, 30 Minuten bei 56°C erwärmtes FKS 50 ml

Na-Azid (Ref. 6688, Merck) 20 g

Diese Lösung wird weiterhin mit HCL bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 –7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf exakt 500 ml verdünnt.

Rückverdünnung:

Bei Gebrauch wird die Flasche mit diesem 10fach konzentrierten FACS-Puffer auf dem Magnetprüher erwärmt, bis der Bodensatz völlig gelöst ist.

Anschließend wird je 50 ml der Lösung mit 450 ml bidestilliertem Wasser rekonstruiert sowie der fertige Puffer mittels einem 0,2 µm Sterilfilter gereinigt.

7.1.3 Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2-7,4

Zu bidestilliertem Wasser wird dazu gegeben:

NaCl (Ref. 6400 Merck)	9,00 g
Na ₂ HPO ₄ (Ref. 6586, Merck)	1,15 g
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (Ref. 6346 Merck)	0,27 g

Nach Einstellung des pH-Wertes der Lösung mit NaOH (Ref.9137, Merck) bzw. HCl (Ref. 9057, Merck) wird diese mit bidestilliertem Wasser auf exakt 1000 ml verdünnt.

7.2 Reagenzien zur Herstellung der Rohzellsuspension

0,1% DNase (Desoxyribonuclease I, Nr. D-5025, Sigma) in PBS pH 7,2-7,4

0,5% Trypsin (Nr. T-1005, Sigma) in PBS, pH 7,2-7,4

7.3 Seren und Antikörper zur Phänotypisierung

7.3.1 Seren

Normal Mouse Serum (Nr. 015-000-120, Dianova)

7.3.2 Direkt mit Farbstoff konjugierte Sekundärantikörper

GaM-FITC (Nr. 115-016-008) Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertes Ziegen-anti-Maus-IgG F(ab')₂-Fragment, spezifisch für Fcγ-Fragmente (Jackson)

7.3.3 Prä-Mix

Es handelt sich dabei um ein vorbereitetes Medium zur Doppelfärbung von 7AAD und

T6RD1. Bei der Herstellung des Reagens wird zur Erkennung der toten Zellen 1 mg

7AAD (7-Aminoactinomycin D, Nr. A-9400, Sigma) in 1 ml DMSO

(Dimethylsulfoxid, Nr. 9678, Merck) gelöst und mit PBS-Azid (0,1%

Natriumazid;Ref. 6688, Merck) in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt. Je 200 µl

dieser 7AAD Lösung in PBS-Azid werden weiterhin mit 30µl T6RD1 Nr. 6603185,

Coulter Electronics), einem an Phykoerythrin (PE) gekoppelten, monoklonalen Antikörper gegen CD1a und mit 270 µl PBS-Azid vermischt.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit durchzuführen und fertigzustellen. Meine Dankbarkeit richtet sich dabei vor allem an:

- Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Wollenberg, der diese Arbeit sowohl während des experimentellen Teils als auch bei der Erstellung des schriftlichen Teils mit viel Geduld, Hilfsbereitschaft und Engagement unterstützt hat.
- Herrn Prof. Dr. med Dr. és sci Th. Bieber, den ich als meinen akademischen und medizinischen Mentor ansehe. Ich habe ihm sehr viel zu verdanken.
- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig für die Möglichkeit, in der Dermatologischen Klinik der LMU München forschen zu können.
- Frau Priv.-Doz. Dr. med. N. Novak, ohne deren liebevolle Unterstützung diese Arbeit niemals abgeschlossen worden wäre.
- Meine Eltern, die mir alle erdenkliche Hilfe bei meinem Studium, der Erstellung dieser Arbeit und dem Aufbau einer beruflichen Zukunft zuteil werden lassen.
- Meinen Bruder Carsten, der mit vielen Ideen die Auswertung der Daten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, unterstützt hat.
- Meine Mitdoktoranden Fr. S. Sharma, Fr. A. Sedlmeir, Herrn Dr. med. S. Kraft sowie Herrn Dr. rer. nat. J. Wessendorf. Die Zusammenarbeit mit ihnen sorgte während der vielen Stunden im Labor sowohl für einen regen Ideenaustausch als auch für viel Spaß.
- Frau Multhaupt, Frau Nau, Frau Orthgiess und Frau Urban für die Unterstützung im Serologischen Labor.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jörg Haberstok
Geburtsdatum	25.8.1968
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Monika Haberstok, Philologin Armin Haberstok, Handelsvertreter

Schulbildung

1975 – 1979	Besuch der Grundschule Stockdorf
1979 – 1989	Besuch des Feodor-Lynen-Gymnasiums Planegg
1986 – 1987	Austauschschüler an der South Charleston High School, South Charleston, West Virginia, USA
24.6.1989	Abitur

Studium

Seit November 1989	Studium der Humanmedizin an der LMU München
September 1991	Physikum
August 1993	I. Staatsexamen
August 1996	II. Staatsexamen
November 1997	III. Staatsexamen

Beruf

1.1.1998 – 30.6.2002	Facharztausbildung an der Dermatologischen Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
12.3.2003	Anerkennung als Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten

10. Publikationen

1. Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, **Haberstok J**, Kraft S, Bieber T (2004) FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J All Clin Immunol*, *in press*
2. Novak N, Allam JP, Betten H, **Haberstok J**, Bieber T (2004) Antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate allergies and they brake allergies. *Allergy* 59:5-14.
3. Novak N, Kraft S, **Haberstok J**, Geiger E, Allam P, Bieber T (2002) A reducing microenvironment leads to the generation of FcεRIhigh inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). *J Invest Dermatol* 119:842-9
4. Kraft S, Wessendorf JH, **Haberstok J**, Novak N, Wollenberg A, Bieber T (2002) Enhanced expression and activity of protein-tyrosine kinases establishes a functional signaling pathway only in FcεRIhigh Langerhans cells from atopic individuals. *J Invest Dermatol* 119:804-11
5. Novak N, **Haberstok J**, Kraft S, Siekmann L, Allam JP, Bieber T (2001) Standardized extracts from Chinese herbs induce IL-10 production in human monocyte-derived dendritic cells and alter their differentiation in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 108:588-93
6. Schuller E, Teichmann B, **Haberstok J**, Moderer M, Bieber T, Wollenberg A (2001) In situ expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 293:448-54
7. Wollenberg A, Sharma S, von Bubnoff D, Geiger E, **Haberstok J**, Bieber T (2001) Topical tacrolimus (FK506) leads to profound phenotypic and functional alterations of epidermal antigen-presenting dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 107:519-25

8. Oppel T, Schuller E, Gunther S, Moderer M, **Haberstok J**, Bieber T, Wollenberg A (2002) Phenotyping of epidermal dendritic cells allows the differentiation between extrinsic and intrinsic forms of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 143:1193-8
9. Plesnila N, **Haberstok J**, Peters J, Kolbl I, Baethmann A, Staub F (1999) Effect of lactacidosis on cell volume and intracellular pH of astrocytes. *J Neurotrauma* 16:831-41
10. Novak N, **Haberstok J**, Geiger E, Bieber T (1999) Dendritic cells in allergy. *Allergy* 54:792-803
11. Wollenberg A, **Haberstok J**, Teichmann B, Wen SP, Bieber T (1998) Demonstration of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/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
12. Bieber T, Kraft S, Jurgens M, Strobel I, **Haberstok J**, Tomov H, Regele D, de la Salle H, Wollenberg A, Hanau D (1996) New insights in the structure and biology of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) on human epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 13:71-5
13. Staub F, Winkler A, **Haberstok J**, Plesnila N, Peters J, Chang RC (1996) Swelling, intracellular acidosis, and damage of glial cells. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 66:56-62
14. Staub F, Mackert B, Kempfski O, **Haberstok J**, Peters J, Baethmann A (1994) Swelling and damage to nerves and glial cells by acidosis. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 29:203-9