

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig

IMMUNHISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES NICKEL-  
INDUZIERTEN KONTAKTEKZEMS ANHAND VON T-ZELLINFILTRAT,  
ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND PROLIFERATIONS-/  
APOPTOSEPHÄNOMENEN

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

vorgelegt von  
Stephan Hackenberg  
aus Aachen  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. P. Thomas

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. C. Klein  
Priv. Doz. Dr. med. R. Huss

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Einteilung allergischer Erkrankungen	7
1.2. Das allergische Kontaktekzem	9
1.3. Histologische Beschreibung	10
1.4. Diagnostik des allergischen Kontaktekzems	11
1.4.1. Hauttest	11
1.4.2. Provokationstestung	12
1.4.3. In-vitro-Diagnostik	13
1.5. Nickel als typisches Kontaktallergen	13
<b>2. Grundlagen</b>	<b>17</b>
2.1. Gegenüberstellung von Th1- und Th2-Antwort	17
2.1.1. Induktion der Th1- und Th2-Antwort	17
2.1.2. Expression von Chemokin-Rezeptoren	19
2.2. Adhäsion und Migration	20
2.2.1. Selektine und ihre Liganden	20
2.2.2. Stabile Adhäsion durch Integrine und ihre Liganden	21
2.3. Proliferation	23
2.3.1. Proliferation in der normalen Haut	23
2.3.2. Nachweismethoden der Proliferation	24
2.4. Apoptose	25
2.4.1. Bedeutung der Apoptose	25
2.4.2. Unterschiede zur Nekrose	25
2.4.3. Auslösefaktoren	26
2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	29

<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1. Patienten	30
3.2. Gewebeproben	32
3.2.1. Gewinnung	32
3.2.2. Weiterverarbeitung der Proben	32
3.3. Grundprinzip der immunhistologischen Technik	33
3.4. Verwendete Materialien	34
3.4.1. Verwendete primäre Antikörper	34
3.4.2. Verwendete Reagenzien und Geräte	35
3.4.3. Herstellung von Puffern und Lösungen	37
3.5. Färbeprotokolle	39
3.5.1. Die HE-Färbung	39
a) Generelle Anmerkungen zur HE-Färbung	39
b) Durchführung	39
3.5.2. Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode	40
a) Generelle Anmerkungen zur ABC Methode	40
b) Durchführung	41
3.5.3. Die APAAP-Methode	42
a) Generelle Anmerkungen zur APAAP Methode	42
b) Durchführung	42
3.5.4. Doppelfärbungen	43
a) Generelle Anmerkungen zu Doppelfärbungen	43
b) Durchführung	45
3.5.5. Nachweismethoden der Apoptose	47
3.5.5.1. Verwendung von Mab gegen ssDNA (F7-26)	47
a) Generelle Anmerkungen zur Methode	47
b) Durchführung	48
3.5.5.2. Nachweis von Fas Rezeptor und Fas Ligand Expression	49
3.6. Kontrollen	49
3.6.1. Positivkontrollen	49
3.6.2. Negativkontrollen	49
3.7. Etablierung der Färbemethoden	51
3.8. Auswertungsverfahren	52

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1. Histologische Beschreibung der Gewebeprobe	55
4.2. Subtypenverteilung im T-Zellinfiltrat	57
4.2.1. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten mit Nickelallergie	57
4.2.2. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten ohne Nickelallergie	59
4.2.3. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten mit Psoriasis vulgaris	61
4.2.4. Zusammenfassung	62
4.3. Expression von CLA und CCR5	63
4.3.1. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten mit Nickelallergie	63
4.3.2. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten ohne Nickelallergie	65
4.3.3. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten mit Psoriasis vulgaris	66
4.3.4. Zusammenfassung	67
4.4. Expression von Adhäsionsstrukturen	68
4.4.1. Adhäsionsstrukturen bei Patienten mit Nickelallergie	68
4.4.2. Adhäsionsstrukturen bei Patienten ohne Nickelallergie	69
4.4.3. Adhäsionsstrukturen bei Patienten mit Psoriasis vulgaris	70
4.5. Ausprägung der proliferativen Aktivität	70
4.5.1. Proliferation bei Patienten mit Nickelallergie	70
4.5.2. Proliferation bei Patienten ohne Nickelallergie	72
4.5.3. Proliferation bei Patienten mit Psoriasis vulgaris	72
4.5.4. Zusammenfassung	74
4.6. Nachweis von Apoptose	74
4.6.1. Apoptose bei Patienten mit Nickelallergie	74
4.6.2. Apoptose bei Patienten ohne Nickelallergie	77
4.6.3. Apoptose bei Patienten mit Psoriasis vulgaris	79
4.6.4. Zusammenfassung	81
4.7. Untersuchungen zur Kolokalisation von CD4 und CCR5	82
<b>5. Diskussion</b>	<b>87</b>
5.1. Charakteristika des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems	87
5.2. Diskussion der Methodik	88

5.3. Ausprägung des T-Zellinfiltrats und funktionelle Beschreibung anhand von Oberflächenmarkern	88
5.4. Zellproliferation als Hinweis auf Allergen-induzierte Aktivierung	93
5.5. Adhäsionsmoleküle als Hinweis für Ekzem-assoziierte Zellrekrutierung	96
5.6. Die Rolle der Apoptose bei der Entstehung des klinischen Bildes des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems	99
5.7. Ausblick	106
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>122</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>123</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Einteilung allergischer Erkrankungen

Der Begriff "Allergie" wurde im Jahre 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet eingeführt. Er verstand darunter eine spezifisch veränderte Reaktionslage sowohl im Sinne von Überempfindlichkeiten als auch von abgeschwächten immunologischen Reaktionen (*Ring, 1991*).

Der heutzutage verwendete Begriff *Allergie* bezeichnet eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit, ausgelöst meist durch exogene, nicht-infektiöse Stoffe. Die hohe Spezifität gegenüber einem bestimmten Allergen ist kennzeichnend für einen allergischen Prozeß. Sie wird in einem symptomlosen Sensibilisierungsprozeß bei Erstkontakt mit dem Allergen erworben und manifestiert sich klinisch in einer überschießenden Entzündungsreaktion nach Zweitkontakt mit dem gleichen Antigen. Hauptmanifestationsorte sind Haut und Schleimhäute, also die Regionen des Körpers, an denen eine Auseinandersetzung mit der Umwelt stattfindet. Theoretisch jedoch können sich Allergien an nahezu allen Organen ausprägen (*Braun-Falco, 1996; Burmester, 1998; Grevers, 2001; Riede Schäfer; Ring, 1991*).

Die 1963 von **Coombs und Gell** eingeführte Klassifikation pathogener Immunreaktionen in vier Typen hat bis heute ihre didaktische Gültigkeit behalten. Von einigen Autoren werden zwei zusätzliche Reaktionstypen (V und VI) beschrieben (*Braun-Falco, 1996; Burmester, 1998; Grevers, 2001; Oethinger, 1997; Riede Schäfer; Ring, 1991*).

- Typ I, Reaktion vom Soforttyp:  
Es handelt sich um eine durch zellständige Immunglobulin (Ig)E-Antikörper vermittelte Ausschüttung von Histamin, Prostaglandinen, Bradykininen und anderen Mediatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten. Dies führt binnen Minuten bis weniger Stunden zur Reaktion (Vasodilatation mit Erythem, Ödem durch Exsudation von Plasmabestandteilen, verstärkte Darmperistaltik

sowie bronchiale Obstruktion). Oft kommt es einige Stunden nach dieser ersten Phase zu einer zweiten "Spätreaktion", welche eher durch den Einfluss eosinophiler Granulozyten geprägt ist. Klinische Beispiele sind Anaphylaxie, allergische Rhinitis, allergisches Asthma bronchiale, allergische Urtikaria, etc.

- Typ II, zytotoxische Reaktion:

In diesem Fall binden Antikörper an Zelloberflächen-Antigene. Über Aktivierung der Komplementkaskade oder von Killerzellen erfolgt dann eine Zytolyse. Meist stellen Medikamente die Haptene dar, welche nach Bindung an beispielsweise Granulozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten zu Agranulozytose, Thrombozytopenie bzw. hämolytischer Anämie führen.

Haptene sind niedermolekulare chemische Verbindungen, welche für die Spezifität eines Antigens verantwortlich, bzw. durch ihre Struktur (Determinante) zur spezifischen Bindung des Antikörpers befähigt sind und im Gegensatz zum Vollantigen keine Allergien erzeugen können. Erst nach der Bindung an einen Carrier (Eiweißkörper) werden sie zum Vollantigen (*Pschyrembel, 1998*).

- Typ III, Immunkomplexreaktion:

Hier kommt es zur Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen in Gefäßwänden oder Membranen mit dadurch verursachter Komplementaktivierung sowie Anlockung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Die Entzündungsreaktion manifestiert sich teils systemisch (z.B. Serumkrankheit, Vasculitis allergica), teils lokalisiert (Arthus-Reaktion).

- Typ IV, Reaktion vom Spättyp:

Durch Sensibilisierung spezifischer T-Lymphozyten entwickeln sich bei Allergenkontakt nach ca. ein bis zwei Tagen beispielsweise allergische Kontaktekzeme, die Tuberkulinreaktion, Transplantatabstoßungen oder Arzneimittelreaktionen. Im nächsten Kapitel wird genauer auf die pathophysiologischen Prinzipien dieser Reaktion eingegangen.

- Typ V, Granulomatöse Reaktion:

Zwei bis fünf Wochen nach Injektion von Fremdstoffen in die Haut entwickeln sich örtlich epitheloidzellige Granulome. Beispiel: Kollageninjektion

- Typ VI, Stimulierende Überempfindlichkeit:

Dieser Typ beinhaltet pathologische Reaktionen durch spezifische Antikörper: Exemplarisch sei genannt die Myasthenia gravis mit Autoantikörpern gegen den Acetylcholin-Rezeptor motorischer Endplatten oder die Autoimmunthyreoiditis durch LATS (Long-Acting Thyroid Stimulator).

Im klinischen Alltag jedoch besitzt diese Einteilung nur eingeschränkte Gültigkeit, da häufig mehrere Reaktionen gleichzeitig ablaufen und sich in ihrer Ausprägung gegenseitig beeinflussen (*Ring, 1991*).

## 1.2. Das allergische Kontaktekzem

Das allergische Kontaktekzem entsteht auf dem Boden einer Überempfindlichkeit und hat typische klinische und dermatohistologische Charakteristika (*Ring, 1991*). Zum klinischen Bild zählen Pruritus, Erythem, Papeln und Vesikel mit anschließender Krustenbildung. Eine entsprechende Stadieneinteilung der akuten Form erfolgte durch Hebra: *Stadium erythematosum et oedematosum* (exsudative Reaktion mit Rötung), *S. vesiculosum et bullosum* (Eruption von Bläschen), *S. madidans* (superfiziell erodierte und nässende Flächen), *S. crustosum* (Trocknen des ausgetretenen Sekrets) und *S. squamosum* (Schuppung) (*Braun-Falco, 1996*). Bei der chronischen Form hingegen werden eher Lichenifikation und Papelbildung beobachtet (*Braun-Falco, 1996; Nasemann, 1982; Ring, 1991*). Die histologischen Charakteristika werden unter 1.3 näher besprochen.

Das pathophysiologische Korrelat des allergischen Kontaktekzems ist eine erworbene, T-lymphozytär geprägte Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) nach Coombs und Gell. Das spezifische Hapten, ein niedermolekulares Molekül, wird über die Haut aufgenommen. Nachdem es durch Bindung an ein meist epidermales oder dermales Trägerprotein zum Vollantigen komplettiert wurde, kommt es zur Erkennung und Aufnahme durch ortsständige dendritische Zellen, sogenannte Langerhanszellen (*Abbas, 1987; Burmester, 1998; Braun-Falco 1996; Grevers, 2001*). Zusammen mit MHC Molekülen der Klasse II erfolgt über Antigenpräsentation und Ausschüttung von Interleukin (IL)-1 aus Langerhanszellen und Keratinozyten die Stimulation spezifischer T-Lymphozyten (Sensibilisierung), die

dann als Gedächtnis-T-Zellen im Organismus zirkulieren. Dieser Vorgang benötigt mindestens 5 bis 7 Tage.

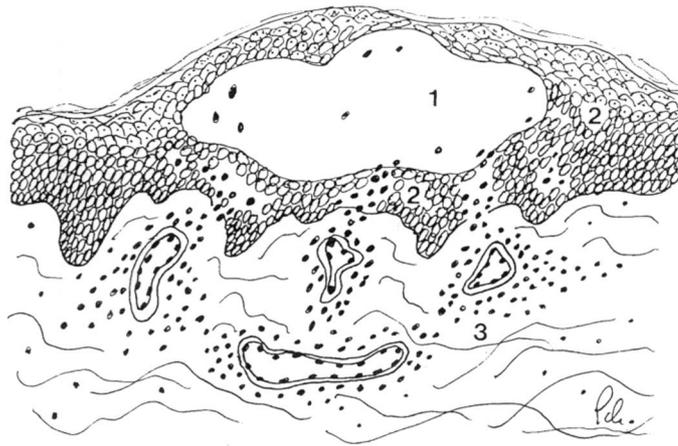
Bei erneutem Kontakt mit geringsten Mengen des Antigens (Reexposition) kommt es gewöhnlich nach 24 bis 72 Stunden zur Proliferation und Aktivierung von allergenspezifischen Effektor-T-Zellen, welche verschiedene Zytokine ausschütten. Hierdurch findet eine Auswanderung (Migration) von Leukozyten aus den Gefäßen in das betroffene Hautareal statt, es bildet sich ein entzündliches Infiltrat aus; klinisch entsteht das Bild eines allergischen Kontaktekzems. Auch in der Reexpositionsphase werden weitere T-Lymphozyten durch ortsständige Langerhanszellen sensibilisiert (*Abbas, 2000; Büdinger, 2000; Burmester, 1998; Grevers, 2001; Ring, 1991*).

Zu den häufigsten Kontaktallergenen zählen niedermolekulare Substanzen und Substanzgemische wie Nickel, Chrom, p-Phenylendiamin, Duftstoffe, Thiurame und Perubalsam. Dabei gibt es expositions-bedingt unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen nach Alter und Geschlecht (s. Kapitel 1.6) (*Ring, 1991; Rycroft, 1995; Schäfer, 2001*).

### **1.3. Histologische Beschreibung**

In der Lichtmikroskopie zeigt die H.E. Färbung folgende Charakteristika des akuten allergischen Kontaktekzems: Der Epidermis aufgelagert ist häufig eine Schicht aus Fibrin und wenigen Granulozyten. Ein wesentlicher Punkt ist die Ausbildung einer epidermalen Spongiose: darunter versteht man die Erweiterung der epithelialen Interzellularräume durch ein in diesem Fall entzündungsbedingtes Ödem. Hierbei bilden sich auch kleine intraepidermale Vesiculae, die teilweise nur durch dünne Septen voneinander getrennt sind, wodurch sich ein mehrkammeriges Blasengebilde entwickelt. In den Bläschenlumina sind Lymphozyten sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten vorhanden. Auch in die Septen und ödematisierten Teile der insgesamt Akanthotischen Epidermis findet eine Invasion von Leukozyten statt.

Vor allem im oberen Bereich des Korioms zeigt sich eine Hyperämie, ödematöse Veränderungen und ein teils diffus, vorwiegend aber perivaskulär angeordnetes Infiltrat aus Lymphozyten, Granulozyten – zum Teil reichlich Eosinophilen –, Histiozyten und Monozyten (*Nasemann, 1982; White, 1990*).



**Abb. 1.1.:** Histologische Darstellung des allergischen Kontaktekzems: 1: intraepidermale Blase; 2: Akanthotisch verbreiterte Epidermis mit Exocytose und Exozytose; 3: im Korium weit gestellt Gefäße, umgeben von einem Infiltrat. Quelle: *Nasemann, 1982*

Die obige Beschreibung trifft für das akute Kontaktekzem zu; die chronische Reaktion unterscheidet sich in diversen Punkten.

#### 1.4. Diagnostik des allergischen Kontaktekzems

Anamnese und klinisches Bild der Erkrankung zählen zu den ersten diagnostischen Maßnahmen. Zur weiteren Abklärung einer Unverträglichkeitsreaktion stehen im Falle des allergischen Kontaktekzems noch Hauttestung und eventuell die Provokation zur Verfügung (*Grevers, 2001; Ring, 1991; Thomas, 2001*).

##### 1.4.1. Hauttest

Hauttestungen müssen stets nach konstanten Protokollen unter Verwendung standardisierter Materialien durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit in der Beurteilung zu gewährleisten. Generell sollte die Einnahme von Medikamenten, welche das Ergebnis beeinflussen können (Antihistaminika, Glukokortikoide und sonstige Immunsuppressiva), ausgeschlossen werden. Zur Abklärung von allergischen Kontaktekzemen wird routinemäßig der Epikutantest (ECT oder „Patch-test“) durchgeführt. Hierbei werden standardisierte Allergenzubereitungen, teils in Vaseline- oder Wasservehikeln, in nicht-toxischen Konzentrationen in sogenannten Finn Chambers, Aluminiumkammern, mit handelsüblichen Pflastern auf einer

ebenen, nicht erkrankten Hautfläche, meist dem Rücken, fixiert. 48 Stunden später werden diese entfernt und es findet eine erste Ablesung statt, eine zweite erfolgt nach weiteren 24 Stunden. Einige Substanzen wie Goldsalze oder Glukokortikoide erfordern aufgrund stärker verzögerter Reaktionen eine letzte Ablesung 7 Tage nach Testbeginn. Im positiven Ausgang des ECT entwickelt sich am Einwirkareal eine Reaktion, welche von erfahrenen Personen nach einem vorgegebenen Schema beurteilt werden sollte:

Bewertung	Aufschlüsselung
<b>0</b>	keine Reaktion
<b>IR</b>	irritative Reaktion (Seifeneffekt, Bläschen, Blase, Nekrose)
<b>?</b>	nur Erythem, kein Infiltrat
<b>+</b>	positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, keine oder wenig Papeln
<b>++</b>	positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, Papeln, Bläschen
<b>+++</b>	positive allergische Reaktion: dichtstehende Papeln, Infiltrat, konfluierende Bläschen

**Tab. 1.1.:** Bewertungsmodus eines ECT Ablesung, Quelle: Empfehlung der ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group)

Im übrigen existieren noch Sonderformen der epikutanen Testung: nur erwähnt seien an dieser Stelle der Fotopatchtest (Kombination aus ECT und Bestrahlung des Hautareals mit UV-Licht) und der offene Patchtest zur Diagnostik der Kontakturtikaria (*Grevers, 2001; Schnuch, 2002; Thomas, 2001*).

#### 1.4.2. Provokationstestung

Diese sollte im symptomfreien Intervall stattfinden unter Bereitstellung von möglicher Notfallbetreuung. Auch hier muss eine Auswertung durch geschultes Personal stattfinden. Im Rahmen der Diagnostik von Kontaktekzemen findet die Provokationstestung allerdings nur bei speziellen Fragestellungen statt, zu Beispiel orale Nickelprovokation bei klinischem Verdacht auf hämatogen ausgelöste dyshidrosiforme Hand- und Fußekzeme (*Grevers, 2001; Lauter, 1994; Thomas, 2001; Veien, 1994*).

### 1.4.3. In-vitro Diagnostik

Der so genannte Lymphozytentransformationstest (LTT) wird nicht zur Routinediagnostik herangezogen, kann aber zum Beispiel bei der Abklärung einer Spättyp-Arzneireaktionen helfen. Es wird die Proliferation von T-Lymphozyten in-vitro unter Zugabe des potentiellen Antigens gemessen und damit auf eine vorhandene Sensibilisierung rückgeschlossen (*Weber-Mani, 2003*). Über Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin wird die DNA-Replikation erkennbar, das heißt die Proliferation der T-Zellen in Anwesenheit des Allergens im Vergleich zu Proben ohne Antigenzusatz (*Burmester, 1998*). Einer dadurch gefundenen Sensibilisierung der T-Lymphozyten kann aber nicht ohne weiteres deren funktionelle Bedeutung zugeordnet werden. Deshalb ist dieser Test für die Routinediagnostik allergischer Erkrankungen nicht geeignet, sondern kommt lediglich für Forschungszwecke zum Einsatz (*Renz, 2002; Thomas, 2001*).

## 1.5 Nickel als typisches Kontaktallergen

Nickel ist ein mit Ni abgekürztes chemisches Nebengruppenelement. Mit der Ordnungszahl 28 gehört es der Eisengruppe an und ist im Reinzustand ein silbrigweißes, stark glänzendes Schwermetall (*Pschyrembel, 1998; Kammerer, 2001*).

In der Natur kommt Nickel als Oxid oder Sulfid zusammen mit Kobalt, Kupfer und kleineren Mengen Palladium, Platin und Gold als Erz verbunden vor. Die Ressourcen sind am größten in Kanada, Australien und Sibirien. Als achtundzwanzigstes Element des Periodensystems wurde Nickel erstmals Mitte des achtzehnten Jahrhunderts vom schwedischen Mineralogen A. F. Cronsted beschrieben, erstmalig isoliert wurde es 1820 von Berthier (*Barceloux, 1999*). Am häufigsten Verwendung findet Nickel, zusammen mit Eisen und Chromium, bei der Herstellung von rostfreiem Stahl (65% des primär verwendeten Nickels). Auch nicht-eisenhaltige Legierungen (13%) und Metallbeschichtungen (9%) spielen eine wesentliche Rolle (*Kammerer, 2001*).

Die Tatsache, dass Nickel allergische Kontaktekzeme auslösen kann, wurde im Jahre 1889 bei Arbeitern aus der Metallindustrie beschrieben. Den ersten Patch-Test zur Diagnostik von Nickelkontaktallergien entwickelten 1925 die Kieler Schittenhelm

und Stockinger. Allerdings sind die natürlich vorkommenden Nickelsulfide und -oxide nicht allergen, weil sie, genau wie das Element Ni, nahezu unlöslich in Wasser und schwachen Säuren sind. Lediglich als Ion (als Hapten mit Proteinen reagierend) kann es zu einer Sensibilisierung und Manifestation eines allergischen Kontaktekzems führen (Rycroft, 1995). Beispiele hierfür sind lösliche Nickelverbindungen wie Nickelsulfat ( $\text{NiSO}_4$ ) oder -phosphat ( $\text{Ni}(\text{PO}_4)_3$ ). Sie haben zwar im Gegensatz zu manch anderen Kontaktallergengemischen wie beispielsweise Benzolverbindungen, ätherischen Ölen oder zahlreichen Pflanzenallergenen eine eher schwache Sensibilisierungspotenz, diese wird jedoch durch einen häufig intensiven Hautkontakt und die weite Verbreitung dieser Ionen aufgewogen. So zählt Nickel im klinischen Alltag zu den häufigsten Auslösern von Kontaktallergien (Braun-Falco, 1996). Auflistung einiger Nickelhaltiger Gegenstände aus dem Alltagsgebrauch:

<b>Nickelhaltige Gegenstände im Alltag</b>	
Modeschmuck	Münzen
Reißverschlüsse	Zahnklammern
Brillenbügel	Bleich- und Haarfärbemittel
Piercings	Farben
BH-Verschlüsse	Mineralölprodukte
Silber- und Weißgoldschmuck	Scheren, Nadeln
Küchengeräte und Bestecke	Uhrenarmbänder

**Tab.1.2.:** Auflistung nickelhaltiger Gegenstände; Quelle: Grevers 2001

Von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung einer Kontaktallergie ist die Nickelmenge in der Epidermis pro Fläche (Einheit  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Durch den menschlichen Schweiß werden Ni-Ionen aus Legierungen gelöst und können als Hapten in die Epidermis eindringen. Also ist für die Entstehung von Kontaktallergien nicht unbedingt der Nickelgehalt einer Metallverbindung von primärer Bedeutung, sondern vielmehr die Menge der Ionen, die aus der Legierung gelöst werden (Rycroft, 1995). Durch Untersuchungen von nickelhaltigen Gegenständen auf ihre allergene Potenz hin konnten Menné et al. im Jahre 1987 eine Grenze für die Expositionsmenge festlegen: Bei Legierungen, die weniger als  $0,5 \mu\text{g Ni}/\text{cm}^2$  pro Woche an die Haut abgeben (beispielsweise rostfreier Stahl oder Weißgold), ist es wenig wahrscheinlich,

dass eine Sensibilisierung ausgelöst wird, im Gegensatz zu solchen, die mehr als diese Menge freisetzen (*Menné, 1987; Rycroft, 1995*). Deshalb dürfen laut Richtlinien der Europäischen Union seit 1996 nickelhaltige, mit der Haut länger in Kontakt tretende Gegenstände nicht mehr als diese Menge freisetzen (*Kammerer, 2001*). Bei sensibilisierten Patienten können allerdings bereits  $0,0075 \mu\text{g Ni/cm}^2$  eine Reaktion hervorrufen. Außerdem kann es durch orale Aufnahme von Nickel bei diesen Patienten zu Exazerbation der Ekzeme kommen. Ungefähr die Hälfte aller Patienten mit einer Kontaktallergie auf Nickel sind in ihrer Arbeitsfähigkeit durch Ekzeme an den Händen gemindert (*Kammerer, 2001*).

Anmerkung: Im Gegensatz zu den Münzen der Deutschen Mark ist anzuführen, dass die neuen Euro-Münzen in ihrer Legierung wesentlich mehr Nickel-Ionen enthalten (circa 25%). Es ist anzunehmen, dass es gerade bei Berufsgruppen, die sehr intensiven Kontakt mit Euromünzen haben, zum Beispiel Kassierer und Kassiererinnen, gehäuft zur Ausbildung von allergischen Kontaktekzemen kommen könnte (*Nestle, 2001; Aberer, 2002*).

**Epidemiologische Daten:** Eine aktuelle Studie zur Erfassung von Sensibilisierungsprävalenzen im Bezug auf Kontaktallergien in Deutschland wurde 2001 von Schäfer et al. veröffentlicht. In der untersuchten Population (1141 Erwachsene) fand sich bei insgesamt 13,1% der Probanden eine positive Reaktion auf Nickel im Epikutantest, wobei Frauen mit 20,4% öfter reagierten als die männlichen Teilnehmer (5,8%). Demnach ist Nickel bei Frauen der häufigste Auslöser von allergischen Kontaktekzemen, knapp gefolgt von Duftstoffen (20,2%), bei Männern steht es an zweiter Stelle. Die altersbezogene Auswertung ergab, dass der Prozentsatz der sensibilisierten Personen mit dem Alter signifikant abnimmt (28-39 Jahre: 23,4%; 40-49 Jahre: 13,3% ; 50-59 Jahre: 8,8% ; 60-78 Jahre: 9,0%) (*Schäfer, 2001*). Andere Studien ergaben vergleichbare Werte (*Nielsen, 1992; Schnuch, 2003*).

Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass Nickel und Kobalt natürlicherweise in einem Erz häufig gemeinsam vorkommen und damit oft bei gemeinsamer Exposition nicht selten eine Überempfindlichkeit gegenüber beiden Elementen besteht.

Eine eher untergeordnete Rolle spielen andere toxische Eigenschaften von Nickel; beispielsweise zeigt es schädigende Wirkungen auf den Respirationstrakt und ist karzinogen (Nasen- und Bronchialkarzinome), wobei diese Effekte nur wenige

Personen betreffen und im Vergleich zum Kontaktekzem hierbei andere Nickelverbindungen (inhalativ aufgenommene Nickelaerosole und -stäube, vor allem Nickelmetall, Nickelsulfid und Nickeloxid) die Ursache darstellen (*Kammerer, 2001*).

## 2. Grundlagen

In dieser Arbeit werden verschiedene Schwerpunkte angesprochen. Daher sollen im folgenden Kapitel einige grundlegende Sachverhalte zu den behandelten Themenkomplexe verdeutlicht werden.

### 2.1. Gegenüberstellung von Th1- und Th2-Antwort

#### 2.1.1. Induktion der Th1- und Th2-Antwort

Das Einwirken eines Antigens auf die Epidermis führt zu einer Ausschüttung verschiedenster Zytokine, unter anderem von Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  und granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) sowie der Chemokine IP-10, monocyte inflammatory cytokine (MIP)-2 und Interleukin (IL)-1 $\alpha$  durch Keratinozyten. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung noch unreifer dendritischer Zellen (DC) und zu einer Akkumulation am Ort der Fremdstoffeinwirkung. Die jetzt reifen DCs wandern mit teilweise hoher Geschwindigkeit (mehrere Millimeter in 30 Minuten) in die regionalen Lymphknoten aus. Während ihrer Wanderung manifestiert sich an den DCs Strukturänderung: sie verlieren die Möglichkeit, Antigene aufzunehmen zugunsten der Fähigkeit, die vorher aufgenommenen Antigene zu präsentieren; sie agieren als hochpotente antigen presenting cells (APCs). Zu diesem Zweck tragen sie nun auf ihrer Oberfläche den peptidbeladenen major histocompatibility complex (MHC) I bzw. II Rezeptor in Assoziation mit kostimulierenden Molekülen. Die auf MHC II Molekülen präsentierten Antigenpeptide führen über eine Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) zu einer Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, durch MHC I werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert. Nach der erfolgten Antigenpräsentation kehren die DCs nicht wieder in das Gefäßsystem zurück, sondern unterliegen dem Zelltod durch Apoptose (*Burmester, 1998; Novak, 1999*).

CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) können unterteilt werden in Th1, Th2 und Th0. Diese Einteilung erfolgt gemäß den unterschiedlichen Zytokinmustern, welche von den jeweiligen Zellen ausgeschüttet werden. **Th1** Zellen sind charakterisiert durch die

Sekretion von **IFN  $\gamma$**  und **IL-2**, wohingegen **Th2** Zellen vor allem **IL-4**, IL-5, IL-9, IL-13 und weniger selektiv IL-10 produzieren (*Burmester, 1998*).

### **Th1 Zellen:**

- IL-2 ist der wichtigste auto- und parakrine Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten. Deswegen wird er auch T-cell growth factor (TCGF) genannt. Zusätzlich kommt es unter TCGF-Einfluß zu einer Stimulation der Produktion anderer Zytokine, zu einer Steigerung der B-Zellproliferation und zu einer Induktion der Toxizität von aktivierten Makrophagen (*Abbas, 2000*).
- IFN $\gamma$  gehört zu den macrophage-activating factors (MAFs) und stellt damit einen wichtigen Aktivator für mononukleäre Phagozyten dar. Außerdem führt IFN $\gamma$  zur Differenzierung einer T-Zelle zu einer Th1 Zelle. Daneben trägt es, gemeinsam mit IL-2, zur Entwicklung von zytolytischen CD8-T-Zellen (CTLs) bei.

### **Th2 Zellen:**

Das wichtigste Zytokin des Th2-Sekretionsmusters IL-4 stellt einen wesentlichen Stimulus für die B-Zellproliferation dar und ist als sogenannter Switch-factor an der Antikörperproduktion, vor allem IgE, beteiligt. IL-5 ist ein Differenzierungsfaktor von eosinophilen Granulozyten.

### **Th0 Zellen:**

Weder der einen noch der anderen T-Zellpopulation zuzuordnen sind Th0 Zellen, man kann sie eher als Vorläufer oder Zwischenform ansehen, da sie sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine ausschütten (*Abbas, 2000; Kaplan, 2001; Roche, 1999*).

Eine Polarisation in Th1 oder Th2 obliegt der antigenpräsentierenden DC. Durch eine Ausschüttung von vor allem IL-12 oder IFN $\gamma$  wird die Induktion einer Th1 Antwort bewirkt, die Polarisation in Richtung Th2 erfolgt über IL-4. Außerdem entscheiden akzessorische Moleküle auf DCs (unter anderem CD80/86) sowie das jeweilige Gewebemilieu über das Ausmaß der Immunantwort (*Novak, 2004*).

### 2.1.2. Expression von Chemokin-Rezeptoren

Chemotaktische Cytokine, auch Chemokine genannt, sind eine Gruppe von Signalstoffen, die im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen ausgeschüttet werden. Es sind bereits über 50 verschiedene Chemokine beim Menschen bekannt. Ihre Hauptaufgaben bestehen einerseits in der Steuerung des afferenten Teils des Entzündungsvorgangs, welcher die Aufnahme und Präsentation von Antigenen durch DCs beinhaltet. Dies führt letztendlich zur Produktion von Antikörpern bzw. zur Entwicklung einer zellulären Immunität. Andererseits findet über Chemokine die Regulation des efferenten Teils der Reaktion statt: Die Einwanderung und Akkumulation von Leukozyten an den Ort einer Entzündung. Hierbei führen Chemokine zunächst zu einer Aktivierung der Leukozyten, die dadurch fest an die endotheliale Oberfläche der Blutgefäße binden und nicht mehr in den Blutkreislauf zurückkehren (siehe Kapitel 2.2). Anschließend wandern die Leukozyten entlang des Konzentrationsgradienten auf die Quelle der Chemokinausschüttung (beispielsweise Keratinozyten, die nach Allergenkontakt zur Chemokinausschüttung stimuliert werden) zu.

Eine wesentliche Bedeutung kommt hier den **Chemokin-Rezeptoren** zu, die auf den verschiedenen Effektorzellen exprimiert werden. Sie können, wie auch die Chemokine selbst, in vier Untergruppen eingeteilt werden: CXC-, CC-, CX<sub>3</sub>- und C-Rezeptoren. Charakteristisch ist der Aufbau aus sieben Transmembrandomänen, die intrazellulär mit einem G-Protein gekoppelt sind. Dadurch wird nach der Bindung eines Chemokins an den Rezeptor eine Kaskade in Gang gesetzt, die zu einer Reaktion innerhalb der Zelle führt (Vestweber, 2001; Kaplan, 2001). Die zelluläre Antwort auf die Chemokinausschüttung hängt ganz vom Rezeptorprofil der Zelle ab. So tragen beispielsweise *unreife* DCs auf ihrer Oberfläche CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6. In Antwort auf Chemokine, die zu Beginn eines entzündlichen Prozesses ausgeschüttet werden, können DCs deshalb am Ort der Entzündung akkumulieren und Antigene aufnehmen. Im Gegensatz dazu regulieren *reife* DCs ihre Rezeptoren für entzündliche Chemokine herunter und exprimieren statt dessen CCR4, CCR7, CXCR4, SLC und ELC. Somit können sie auf Signale reagieren, die sie zu den regionalen Lymphknoten leiten. Dort schütten die DCs selbst Cytokine aus: Diese

determinieren einerseits, welches Cytokinmuster die durch diesen Vorgang stimulierte T-Zelle ausschütten wird. Andererseits wird auch das Chemokin-Rezeptor-Repertoire der T-Zelle bestimmt: So führt die Ausschüttung von IL-12 oder IFN $\gamma$  durch DCs zur Polarisation der stimulierten T-Lymphozyten zu Th1, welche CCR5 und CXCR3 exprimieren. Th2 Zellen hingegen sind gekennzeichnet durch die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR3, CCR4 und CXCR5. Diese Tatsache bietet einem die Möglichkeit, die T-Zellen anhand ihrer Chemokin-Rezeptoren entweder Th1 oder Th2 zuzuordnen (Novak, 1999; Kaplan, 2001; Loetscher, 1989; Ødum, 1999). Der in dieser Arbeit untersuchte Chemokin-Rezeptor **CCR5** kommt sowohl auf aktivierten Th1-Zellen, als auch auf Monozyten, DCs und natürlichen Killerzellen vor. Die korrespondierenden CC-Chemokine, an die er bindet, sind RANTES, Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1)  $\alpha$  und  $\beta$ .

## 2.2. Adhäsion und Migration

### 2.2.1. Selektine und ihre Liganden

Bei der Leukozyteneinwanderung in entzündliches Gewebe spielen **Selektine** eine wichtige Rolle. Sie sind verantwortlich dafür, dass Leukozyten ihre Fließgeschwindigkeit ungefähr um das hundertfache reduzieren und statt dessen langsam auf der Gefäßwandoberfläche „rollen“. Drei Vertreter dieser Adhäsionsstrukturen, E-, P- und L-Selektin, sind bisher beim Menschen bekannt (Vestweber, 2001). L-Selektin ist auf einer Vielzahl von Leukozyten, hauptsächlich aber auf neutrophilen Granulozyten, unabhängig von einem entzündlichen Reiz vorhanden. Im Gegensatz dazu werden die anderen Selektine ausschließlich nach Aktivierung, beispielsweise durch inflammatorische Impulse auf dem Endothel exprimiert. P- Selektin findet sich zusätzlich noch auf Thrombozyten. Der Aufbau der Selektine besitzt ein einheitliches Grundschema, stets sind fünf Domänen zu unterscheiden: eine n-terminale C-Typ Lektin Region, einen Epidermal growth factor EGF Anteil und ein Abschnitt bestehend aus einer für das jeweilige Selektin charakteristischen Anzahl von Complement regulatory protein-like CRP Domänen. Diese drei Teile befinden sich extrazellulär. Es folgt ein transmembranöser Abschnitt, komplettiert werden die Moleküle durch eine kurze zytoplasmatische Sequenz (Abbas, 2000).

In dieser Arbeit wird das Verhalten von E-Selektin, auch CD62E oder ELAM-1 (endothelial-leucocyte adhesion molecule 1) genannt, untersucht. Im Rahmen einer Entzündung kommt es durch Zytokinstimulation zu einer Transkription der CD62E-mRNA, somit also zu einer auf Genexpressionsebene regulierten Neusynthese von E-Selektin in der Endothelzelle. Verantwortlich sind hierbei vor allem IL-1 und TNF $\alpha$ . Sie führen zu einem Expressionsmaximum ca. 4 bis 6 Stunden nach Stimulationsbeginn. E-Selektin bewirkt die Adhäsion von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten, aber auch von Monozyten, T-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Wenn kein weiterer Zytokineinfluss erfolgt, wird E-Selektin nach 24 bis 48 Stunden wieder komplett abgebaut. IFN $\gamma$  besitzt zwar nicht die Fähigkeit, eine Neusynthese von CD62E zu initiieren, allerdings führt die Anwesenheit dieses Zytokins zu einer Verlängerung der Expression (*Abbas, 2000*).

E-Selektin stellt in seinem Bindungsverhalten eine Ausnahme gegenüber den anderen Selektinen dar. Letztere binden vor allem an Glykoproteinstrukturen, die zu den Sialomucinen zählen. E-Selektin bindet auch an andere Glykoproteine, beispielsweise solche, bei denen die Sialinsäure durch Sulfatgruppen ersetzt ist. Beispiele für E-Selektin-Liganden beim Menschen: L-Selektin, PSGL-1 und CLA auf Leukozyten (*Abbas, 2000; Vestweber, 2001; Bevilacqua, 1993*). CLA (cutaneous lymphocyte antigen) ist ein Molekül, das auf T-Lymphozyten, die in die Haut einwandern, exprimiert ist (*Babi, 1995; Picker, 1995; Fuhlbrigge, 1997*). Um eine CLA-Expression auf T-Lymphozyten zu erreichen, ist eine  $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-Aktivität notwendig (*Babi, 1995*).

### **2.2.2. Stabile Adhäsion durch Integrine und ihre Liganden**

Wie bereits oben erwähnt, liefern die Selektine nur eine schwache Anheftung der Zellen an die Gefäßwand, sie sind eher als Initiatoren der Einwanderung zu verstehen (*Bevilacqua, 1993*). Eine definitive und stabile Adhäsion wird durch **Integrine** auf den Leukozyten und deren endotheliale Liganden bewirkt. Die Aufgabe der Integrine besteht darin, die Adhäsion einerseits zu extrazellulären Matrixmolekülen, andererseits direkt zu Zellen herzustellen. Befindet sich die Zelle im inaktivierten Zustand, binden die zellulären Integrine kaum an ihre Liganden. Nach einer Stimulation durch Chemokine jedoch wird durch Strukturänderungen die

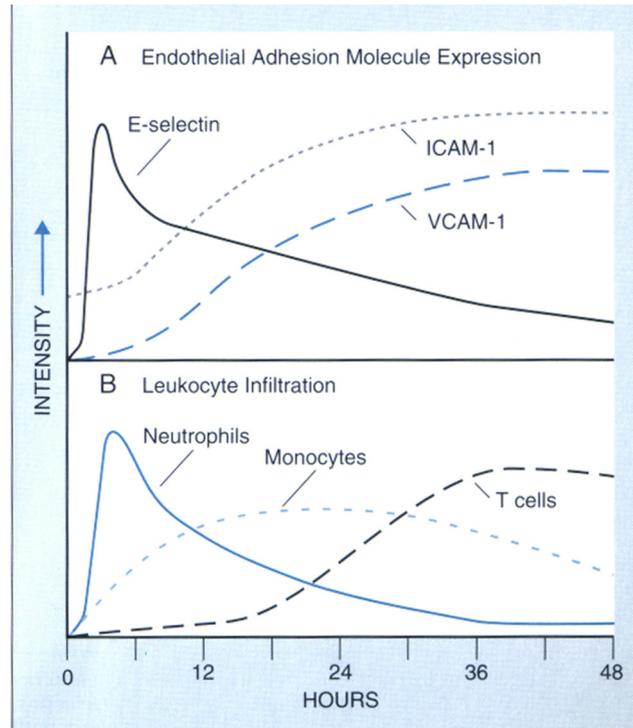
Affinität der Integrine zu ihrem Liganden erheblich gesteigert. Erst durch diesen Aktivierungsvorgang ist eine effektive Anheftung ans Endothel möglich.

Chemokine haben deshalb einen wichtigen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Leukozyten. Neben der Integrinaktivierung führen sie außerdem zu strukturellen Veränderungen im Zytoskeletts der Leukozyten, wodurch die Zellen relativ fest mit der Gefäßwand verbunden am Endothel entlang wandern können (*Vestweber, 2001*).

VLA-4( $\alpha 4\beta 1$ ), LPAM-1( $\alpha 4\beta 7$ ), LFA-1( $\alpha L\beta 2$ ) und MAC-1( $\alpha Mb\beta 2$ ) sind die vier wichtigsten Vertreter der 21 verschiedenen Integrinmoleküle (*Abbas, 2000; Babi, 1995*).

Die endothelialen Bindungspartner der Integrine sind Glykoproteine, welche aufgrund ihres Aufbaus der Immunglobulinfamilie zuzuordnen sind. Wichtige Vertreter sind zum Beispiel ICAM-1 (CD54; Intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). Die Expression dieser beiden Liganden wird, ähnlich wie bei E-Selektin, durch Zytokinstimulation (TNF $\alpha$  und IL-1) auf m-RNA-Transkriptionsebene reguliert. Deshalb sind sie in inflammatorischen Geweben hochreguliert nachweisbar. Dadurch wird verhindert, dass eine Adhäsion an nicht entzündlichem Endothel stattfindet. ICAM-1 ist aber nicht nur auf der Endotheloberfläche zu finden, auch andere Zell-Zell-Kontakte werden vermittelt. CD54 befindet sich unter anderem auf B- und T-Lymphozyten, auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und auf Fibroblasten. Auch Keratinozyten exprimieren ICAM-1 im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Dadurch haben Integrintragende Lymphozyten die Möglichkeit, eine direkte Bindung mit Keratinozyten einzugehen (*Abbas, 2000; Singer, 1989*).

Zusammenfassung: Es wird deutlich, dass Adhäsion und Migration Prozesse darstellen, welche in mehreren zeitlichen Stufen ablaufen. Abhängig vom Zeitpunkt dominieren unterschiedliche Adhäsionsmoleküle. Dies wird in folgender Grafik verdeutlicht.



**Abb. 2.1.:** Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expression von endothelialen Adhäsionsstrukturen und der daraus resultierenden Leukozyten-Infiltration nach Antigenexposition bei einer sensibilisierten Person. Quelle: Abbas, 2000

Selektine mit ihren Liganden vermitteln eine frühe und initiale Phase der Zelladhäsion (4 bis 24 Stunden nach Allergenkontakt). Im Gegensatz dazu wird das stabilere Integrin-Integrinligand-System eher zu einem späteren Zeitpunkt relevant.

## 2.3. Proliferation

### 2.3.1. Proliferation in der normalen Haut

Die Epidermis ist eines der Gewebe des menschlichen Organismus, welches über die gesamte Lebensdauer mitotisch aktiv ist (Valyi-Nagy, 1992). Die Mehrzahl der Mitosen läuft im Stratum basale ab, der Regenerationsschicht, die der Basalmembran aufliegt. Deshalb nennt man diese Schicht gemeinsam mit dem Stratum spinosum, wo vereinzelt ebenfalls Mitosen zu finden sind, Stratum germinativum. Von den bei einer Zellteilung entstehenden Tochterzellen wandert eine als Keratinozyt unter Änderung ihrer Morphologie an die Oberfläche, wobei sie anfangs hochprismatisch, später dann immer flacher erscheint. Von der Teilung bis

zur Desquamation verstreichen durchschnittlich 30 Tage. Die andere Tochterzelle bleibt vor Ort und teilt sich erneut (*Leonhardt, 1990*).

### 2.3.2. Nachweismethoden der Proliferation

Zunächst kann die proliferative Aktivität eines Gewebes histologisch über die Auszählung der Mitosefiguren im Lichtmikroskop bestimmt werden. Diese Technik ist allerdings sehr zeitaufwendig und im Gegensatz zu immunhistochemischen Methoden weniger sensitiv.

In vorliegender Arbeit wurden zur Darstellung proliferativer Vorgänge Antikörper gegen Ki-67 verwendet: Das Protein Ki-67 wurde erstmals 1983 von Gerdes et al. beschrieben als das passende Antigen zu einem von ihnen entdeckten Antikörper. Ki-67 ist ein Kernprotein, welches ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-Phase und Mitose) nachweisbar ist, nicht aber in ruhenden Zellen (G0-Phase). Während der Mitose kann das Protein auf der Oberfläche der Chromosomen lokalisiert werden, in der Interphase allerdings nur im Kern. Deshalb stellt Ki-67 eine wichtige diagnostische Möglichkeit dar, die Zelle in ihrer proliferativen Aktivität zu beschreiben (*Ando, 1990; Endl, 2000; Gerdes, 1991*). Von großer praktischer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang außerdem, dass das Antigen, sobald die Zelle den Zellzyklus verlässt, sehr bald degradiert wird und somit nicht mehr nachweisbar ist. Somit korreliert die Nachweisbarkeit bzw. Abwesenheit von Ki-67 zeitlich sehr eng mit der Zellzyklusphase. Ki-67 wird vor allem in der Tumordiagnostik zur Bestimmung der sogenannten *growth fraction* verwendet. Aber auch in Forschungsbereichen der Gebiete Wundheilung, Alterung, Entwicklungsbiologie und anderen kommt Ki-67 zum Einsatz (*Endl, 2000; Scholzen, 2000*).

Diese Methode gilt als besonders sensitiv, da Zellen in allen aktiven Zyklusphasen erfasst werden. Allerdings sollte immer beachtet werden, dass die Bestimmung der *growth fraction* mit Ki-67 nur Aussagen über den Status der Zelle zulässt (aktiver Zyklusstatus), die effektive Proliferationsrate jedoch nicht bestimmt werden kann, da diese lediglich von der Zahl der stattfindenden Mitosen abhängt. Bis heute ist die eigentliche Funktion des Ki-67 Antigens noch nicht vollständig geklärt.

## 2.4. Apoptose

### 2.4.1. Bedeutung von Apoptose

Der Begriff *apo ptosis* kommt aus dem Griechischen und bedeutet "herunterfallen". Der Tod meist einzelner Zellen in einer ansonsten unversehrten Zellpopulation sollte mit dem Herunterfallen vertrockneter Blätter von einem Baum verglichen werden. Da Apoptose einen genetisch determinierten Vorgang darstellt und ohne Schädigung der Zellintaktheit von außen stattfindet, wird sie auch als "natürlicher Zelltod" bezeichnet (*Weimann, 1999*). Vor allem in der Zellmauserung, im geregelten Absterben von überflüssigen Organanlagen in der Embryonalentwicklung, bei Anpassungen an veränderte Hormonbedingungen, und vielen anderen physiologischen Vorgängen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Der Minuten- bis wenige Stunden dauernde Vorgang wird initiiert durch die Aktivierung einer komplexen Enzymkaskade (Caspasen), welche letztendlich zu einer Fragmentierung der DNA führt, wobei die hieraus entstehenden Bruchstücke eine Länge von ca. 200 Basenpaaren aufweisen. Im histologischen Bild findet sich initial eine Zellkondensation und -schrumpfung mit noch intakten äußeren und inneren Membranen. Nach der kompakten Anlagerung des Chromatins an der inneren Kernmembran zerfällt der Nukleus in Granula. Zu diesem Zeitpunkt hat sich die Zelle bereits aus dem umgebenden Zellverbund gelöst. Schließlich entstehen durch Ablösung blasenförmiger Protuberanzen (Abkugelung) von der Zelloberfläche sogenannte "apoptotic bodies", welche von Makrophagen oder anderen benachbarten Zellen ohne das Auftreten von entzündliche Phänomenen phagozytiert werden (*Hockenbery, 1995; Kane, 1995; Leonhardt, 1990; Majno, 1995; Weedon, 1979; Wyllie, 1997*).

### 2.4.2. Unterschiede zur Nekrose

Als Nekrose wird der Untergang eines Gewebekomplexes infolge schädigender Einflüsse (schwere Hypoxie, extreme Temperaturen, Toxine) bezeichnet. Es kommt zu einer osmotisch bedingten Zellschwellung und zum Austritt entzündungsvermittelnder Substanzen (Zytotoxine wie IL-2). Durch die Anlockung von Granulozyten und Monozyten setzt eine Entzündungsreaktion ein, die zur Nekroseaufweichung des betroffenen Areals führt. Die wichtigsten

Unterscheidungsmerkmale zwischen Apoptose und Nekrose sind in folgender Tabelle kurz gegenübergestellt (*Leonhardt, 1990; Majno, 1995; Riede 1998*).

<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
Untergang einzelner Zellen	Untergang von Zell- und Gewebekomplexen
streng regulierter Prozess nach Aktivierung einer komplexen Enzymkaskade mit hemmenden und fördernden Stimuli	Regulationsverlust
genetisch determiniert	keine Determination
Induktion durch physiologische und pathologische Faktoren	meist durch unphysiologische Störfaktoren induziert
Zellschrumpfung bis zum "apoptotic body"	Zellschwellung und Lyse
Zytoplasmaausstülpungen an der Zelloberfläche führt zur Bildung membranumgebener Blasen	Integritätsverlust
Lysosomen intakt	Lysosomen zerstört
Chromatinkondensation zu eine einheitlichen, dichten Masse	klumpige, defekt-typische Aggregation des Chromatins: Karyorhexis
Phagozytose durch angrenzende Zellen und / oder Makrophagen	Phagozytose durch Zellen des mononukleären Phagozytosesystems
keine begleitende Entzündung	entzündliche Reaktion

**Tab. 2.1.:** Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose; Quelle: *Browder 1998*

### 2.4.3. Auslösefaktoren

Der programmierte Zelltod kann durch diverse Faktoren ausgelöst werden. Hier sollen exemplarisch einige Beispiele angeführt werden:

**Auslösesituationen:**

- Erreichen einer bestimmten Mitosezahl beim Entwicklungswachstum embryonaler Gewebe
- Erreichen eines bestimmten Zellalters bei Erythropoese, enchondraler Ossifikation, ...
- Verlust funktionserhaltender Signalstoffe, z.B. in endokrinen Organen, Endometrium
- Verlust der Zell-Extrazellulärmatrix-Kommunikation (Anoikis)

**Induktoren:**

- Physikalische Noxen: DNA-Schädigung durch Strahleneinwirkung (Gamma-, UV-Strahlung), Hyperthermie
- Wachstumsfaktorentzug
- Umverteilung von intrazellulärem Calcium vom endoplasmatischen Retikulum in die Mitochondrien
- Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$  aus Makrophagen
- Suppressorgene wie das p53. p53 stellt ein Wächterprotein des Genoms dar, indem es den Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase anhält, sodass die Möglichkeit besteht, DNA-Schäden zu reparieren. Bei Nicht-Gelingen leitet p53 die Apoptose ein
- Chemotherapeutische Wirkung , z.B. im Rahmen einer Zytostatikatherapie
- freie Radikale
- Bindung von Fas-Ligand an den Fas-Rezeptor CD 95 (s.unten)
- u.v.a.

(Abbas, 2000; Burmester, 1998; Reed, 1994; Riede 1998; Silbernagl, 1998; Weedon, 1995)

**Auslösung durch FasR:**

Der Fas-Rezeptor (FasR), auch CD 95 oder APO-1 genannt, induziert Apoptose bei den Zellen, die ihn auf ihrer Oberfläche exprimieren. Er gehört mit den Tumornekrosefaktor-(TNF) Rezeptoren und dem B-Zellaktivierungsmolekül CD 40 zu

einer Proteinfamilie, deren Mitglieder für ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und programmiertem Zelltod sorgen: FasR und TNF-Rezeptor1 sind apoptose-induzierende Rezeptoren, wohingegen CD 40 und TNF-Rezeptor2 proliferative Signale transduzieren. Das Fas Protein hat eine extrazelluläre zysteinhaltige Bindungsdomäne für den Fas-Liganden (FasL) und eine intrazelluläre Domäne, die sogenannte Death domain. Aktiviert wird CD95 durch die Interaktion mit FasL, einer Proteinstruktur, die sich zum Beispiel auf T-Lymphozyten befindet. Innerhalb weniger Sekunden nach Fas-Ligand-Bindung lagern sich zwei Proteine an die Death domain an: FADD (Fas-associated death domain) und Procaspase-8 sind zwei intrazelluläre Moleküle, die mit dem aktivierten FasR einen Komplex bilden, den death-inducing signalling complex DISC. Durch proteolytische Spaltung der Procaspase-8 entsteht Caspase-8, welche den DISC verlässt und zur Aktivierung weiterer Proteine, beispielsweise Caspase-3,-6,-7, führt. Diese Enzymkaskade endet schließlich mit der Fragmentierung des DNA-Strangs.

Auch die Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNF-Rezeptor1 initiiert die Aktivierung einer Caspase-Kaskade und somit den apoptotische Zelltod (*Abbas, 2000; Browder, 1998; O' Connel 2001; Ekert, 1997;Krammer, 2000; Newton, 2000; Sharma, 2000; Walczak, 2000; Weedon, 1979*).

## 2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Arbeit beschäftigt sich damit, Charakteristika des Nickel-induzierten Kontaktekzems über Immunhistologie von Hautproben zu untersuchen. Dazu dient der Vergleich von Ekzemreaktionen im Nickel-Epikutantestareal bei Personen mit Nickelkontaktallergie mit klinisch reaktionsloser Haut im Nickel-Epikutantestfeld von nicht allergischen Personen und mit Plaquearealen bei Patienten mit Psoriasis vulgaris. Dabei wurde versucht, das Zellinfiltrat über Differenzierungsantigene (T-Zelltypisierung) und Funktions-assoziierte Antigene näher zu beschreiben. Dies soll zur Beurteilung von Phänomenen wie Blasenbildung, Zelltod und Proliferation dienen. Da gerade das Nickelkontaktekzem ein sehr häufiges Krankheitsbild darstellt, haben sich bereits viele Arbeitsgruppen mit dieser Thematik auseinandergesetzt. Allerdings sind oft kontroverse Daten in den verschiedenen Veröffentlichungen zu finden. Deswegen lohnt es sich, in diversen Bereichen gezielte Nachforschungen anzustellen und die gefundenen Ergebnisse mit den bereits vorhandenen zu vergleichen und zu diskutieren.

In dieser Abhandlung wurden einige Schwerpunkte gesetzt: Die Arbeit beschränkt sich auf eine frühe Phase des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems (72 Stunden nach Provokationsbeginn). Vier wesentlich Punkte fanden in den Untersuchungen Beachtung:

- weitere Aufschlüsselung des T-Zellinfiltrats und dessen funktionelle Einordnung anhand von Untersuchungen bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern
- Expression von Adhäsionsmolekülen im Gewebe und auf dem Endothel sowie von korrespondierenden zellständigen Liganden zur Beschreibung von Migrationsvorgängen
- Untersuchung der Zellproliferation von Gewebe und Infiltrat als Hinweis für inflammatorisch getriggerte Aktivierung
- Beschreibung der Rolle der Apoptose, deren Auslösung, Ausprägung und Verteilung

### 3. Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden Stanzbiopsien aus Epikutantestarealen von Patienten mit Ekzemreaktionen im Nickelfeld gewonnen. Als Vergleichsproben dienten einerseits Stanzbiopsien aus Epikutantestfeldern ohne klinische Reaktion und andererseits Biopsien aus Arealen akut entzündlicher Psoriasis vulgaris.

#### 3.1. Patienten

Die erste Gruppe bestand aus zehn Patienten, die bei einem Standard-Epikutantest eine Ekzemreaktion im Nickelfeld zeigten. Es handelt sich hierbei um 8 Frauen und 2 Männer. Das Durchschnittsalter betrug 39 Jahre. Anmerkung: Die Nummerierung der Patienten richtet sich nach dem chronologischen Eintreffen aller Gewebe im Labor. Da zwischenzeitlich auch anderweitig verwendete Materialien eingegangen waren, sind die Benennungen teilweise diskontinuierlich.

Patient	Geschlecht	Alter	Ekzem durch nickelhaltige Materialien	ECT-Ergebnis im Nickel-Testareal
X1 T.G.	w	31	ja	+++
X2 A.I.	w	31	ja	++
X3 P.N.	m	36	ja	+++
X5 M.K.	w	47	ja	++
X6 T.W.	w	24	ja	+
X7 D.T.	w	33	ja	++
X8 H.G.	w	53	ja	+
X9 K.J.	w	36	ja	++
X11 R.S.	m	56	ja	++
X15 B.B.	w	43	ja	+++

**Tab. 3.1.:** Klinische Daten zu Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: w = weiblich; m = männlich; 0 = keine Reaktion; + = positive allergische Reaktion: Erythem, Infiltrat, keine Papeln; ++ =

Erythem, Infiltrat, Papeln, Bläschen; +++ = positive allergische Reaktion: dichtstehende Papeln, Infiltrat, konfluierende Bläschen.

Die zweite Gruppe bestand aus 5 Patienten. Diese Patienten zeigten im Rahmen einer allergologischen Diagnostik verschiedene Kontaktallergien im Epikutantest – allerdings keine Reaktion im Nickelareal. Stanzbiopsien wurden aus den klinisch reaktionslosen Nickelfeldern entnommen.

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Ekzem durch nickelhaltige Materialien</b>	<b>ECT-Ergebnis im Nickel-Testareal</b>
<b>A 39 R.S.</b>	<b>w</b>	<b>69</b>	<b>nein</b>	<b>0</b>
<b>A 40 M.K.</b>	<b>w</b>	<b>81</b>	<b>nein</b>	<b>0</b>
<b>A 43 E.M.</b>	<b>w</b>	<b>41</b>	<b>nein</b>	<b>0</b>
<b>A 44 J.F.</b>	<b>m</b>	<b>81</b>	<b>nein</b>	<b>0</b>
<b>A 60 M.C.</b>	<b>w</b>	<b>36</b>	<b>nein</b>	<b>0</b>

**Tab. 3.2.:** Klinische Daten zu Patienten ohne Nickelkontaktallergie. Abkürzungen: s. Tab. 3.1.

Die dritte Gruppe bestand aus 5 Patienten mit akut entzündlicher Psoriasis vulgaris.

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>
<b>A 30 P.J.</b>	<b>m</b>	<b>67</b>
<b>A 31 I.C.</b>	<b>m</b>	<b>65</b>
<b>A 32 G.R.</b>	<b>w</b>	<b>40</b>
<b>A 33 A.H.</b>	<b>w</b>	<b>39</b>
<b>A 34 R.F.</b>	<b>m</b>	<b>57</b>

**Tab. 3.3.:** Klinische Daten zu Patienten mit Psoriasis vulgaris, Abkürzungen : s. Tab. 3.1.

## **3.2. Gewebeproben**

### **3.2.1. Gewinnung**

Erhalt von Hautproben in Form von Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 3mm aus

- Epikutantestarealen nach 48-stündiger Provokation mit Nickelsulfat: Proben von NiSO<sub>4</sub> wurden hierbei mit Hilfe einer Finn Chamber aus Aluminium und einem Pflaster auf eine ebene, gesunde Hautstelle (Rücken) aufgebracht (Vorgehen wie beim Routine-ECT; siehe 1.4.1.). Die Provokation wurde nach ca. 48 Stunden durch die Abnahme der Finn Chamber beendet. Bei den 10 Patienten, die aus der Anamnese als nickelallergisch bekannt waren, entwickelte sich ein akutes Kontaktekzem. Aus diesen Arealen wurden etwa 24 Stunden später (72 Stunden nach Provokationsbeginn), somit also in einem frühen Stadium der Ekzemreaktion, Stanzbiopsien entnommen. Bei den 5 Patienten, die im Epikutantest keine allergische Reaktion auf Nickel zeigten, wurden aus den klinisch reizlosen Nickelfeldern des Epikutantests entsprechende Stanzbiopsien entnommen.
- Plaquearealen einer akut entzündlichen Psoriasis vulgaris von 5 Patienten

Alle Proben wurden von volljährigen Spendern gewonnen, welche als Patienten bei der allergologischen Abklärung von Hauterkrankungen eine Hauttestung erhalten hatten und einer zusätzlichen Stanzbiopsie zu Forschungszwecken nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und mindestens 24 Stunden Bedenkzeit zugestimmt hatten. Der an der Entnahmestelle entstandene Hautdefekt wurde anschließend jeweils mit einer Einzelknopfnahmt verschlossen und einem Pflaster versorgt.

### **3.2.2. Weiterverarbeitung der Proben**

Die gewonnenen Stanzbiopsien wurden sofort in Plastikschrälchen (Cryomold Tissue Tek Intermediate Specimen Molds) gegeben und mit Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing Medium) eingedeckt. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Gewebe wurde schließlich in Aluminiumfolie eingewickelt und in Gefriertüten aus Plastik bei -20°C aufbewahrt.

An einer Kryostatschneidebank wurde dann das Gewebe bei  $-30^{\circ}\text{C}$  zu 5 bis 6  $\mu\text{m}$  dicken Schichten (sog. Kryostatschnitte) verarbeitet und jeweils zwei Präparate in direkter Schnittfolge auf Glasobjektträger aufgebracht. Diese haben eine Fläche von  $25 \times 75 \text{ mm}^2$  und sind durch eine Poly-L-Lysin-Beschichtung permanent elektrostatisch positiv geladen, wodurch die Gewebeschnitte besser an der Glasoberfläche haften bleiben. Beim Anfertigen der Gefrierschnitte war darauf zu achten, dass am Kryostat eine möglichst niedrige Temperatur (ca.  $-30^{\circ}\text{C}$ ) einzustellen war, damit es durch den hohen Fettgehalt der Proben nicht zu Schäden während des Schneidevorgangs kam. Insbesondere eine Abtrennung der Epidermis vom Restgewebe sollte verhindert werden. Trotzdem fiel die Qualität der Schnitte gewebeabhängig unterschiedlich aus. Die Objektträger wurden nach einer Trocknungszeit von mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Aceton fixiert. Nach 30-minütiger Trocknungszeit wurden jeweils zwei Objektträger Rücken an Rücken in Aluminiumfolie eingewickelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert.

### 3.3. Grundprinzip der immunhistologischen Technik

In dieser Arbeit wurden immunhistologische Untersuchungen unter Verwendung monoklonaler Antikörper vorgenommen. Antikörper sind lösliche Proteinmoleküle, welche die spezifische humorale Immunreaktivität vermitteln. Monoklonalität bedeutet, dass die entsprechenden Antikörper von B-Lymphozyten eines Klon produziert werden, somit alle die gleiche Primärstruktur besitzen und dieselben Antigen-Bindungseigenschaften haben (*Boenisch, 2001; Burmester, 1998; Keller, 1994*). Die monoklonalen Antikörper werden im Rahmen von immunhistologischen Färbungen auf das Gewebe aufgetragen und lagern sich an den Stellen ab, an welchen sich die nachzuweisenden Antigene befinden. In allen hier durchgeführten Färbetechniken folgt nach dem Aufbringen der monoklonalen Antikörper, welche im Hautpräparat entsprechende Strukturen nachweisen sollten (**Primärantikörper**), als nächster Schritt die Aufbringung eines **Brückenantikörpers**, der sich an den Fc-Teil des Primärantikörpers anlagert. Dieser wird schließlich abhängig von der angewandten Technik auf unterschiedliche Art und Weise mittels eines Farbstoffs sichtbar gemacht. Dadurch wird exakt die Antigenverteilung im Gewebe sichtbar gemacht. Weitere Informationen zu den unterschiedlichen Vorgehensweisen bei den

einzelnen Methoden finden sich im Kapitel 3.5. (Boenisch, 2001; Burmester, 1998; Cordell, 1984).

### 3.4. Verwendete Materialien

#### 3.4.1. Verwendete primäre Antikörper

Hintergrundinformation zu den Antigenen, die mit den primären Antikörpern nachgewiesen werden sollten, findet sich in den Grundlagen (Kapitel 2)

Primärantikörper	Klon	Firma	Verdünnung	Isotyp
anti - CD 3	T3-4B5	DAKO	1:1000	IgG1, κ
anti - CD 4	MT310	DAKO	1:50	IgG1, κ
anti - CD 8	DK25	DAKO	1:200	IgG1, κ
anti - CD 62 E	68-5H11	PharMingen	1:500	IgG1, κ
anti - CLA	HECA-452	PharMingen	1:500	IgM
anti - Ki67	MIB-1	DAKO	1:150	IgG1
anti - ssDNA	F7 - 26	Alexis	10µg / ml BSA	IgM
anti - CCR5	MC-5	*)	1:200	IgG1
anti - CD95L	G247-4	PharMingen	1:20	IgG1, κ
anti - CD95	DX2	PharMingen	1:2000	IgG1, κ
anti - CD54	RR1/1	Alexis	1:2500	IgG1, κ
<b>Isotypkontrollen</b>				
IgG1	REF 0280	Dianova - Immunotech	1:100	
IgM	X 0942	DAKO	1:150	

**Tab. 3.4.:** Daten zu den verwendeten primären Antikörpern

\*) der Antikörperklon MC-5 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Mack, Medizinische Poliklinik der LMU München, zur Verfügung gestellt (Mack; 2000)

Ergänzungen zu einigen Antikörpern:

- anti-CD3-Antikörper: Das CD3 Antigen ist bereits auf frühen Thymozyten vorhanden und kann ab hier in der gesamten T-Zelllinie als

Oberflächenmolekül nachgewiesen werden, welches eng mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert ist. Seine Funktion besteht in der Signaltransduktion nach TCR-MHC-Kontakt. MHC (major histocompatibility complex) Moleküle präsentieren den T-Zellen antigene Strukturen (*Abbas, 2000; Burmester, 1998, Oethinger, 1997*).

- anti-CD4-Antikörper: Das CD4 Molekül ist charakteristischerweise auf T-Helferzellen exprimiert, findet sich aber auch auf Thymozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten. Es ist für die Interaktion mit MHC-Klasse-II-Molekülen verantwortlich (*Abbas, 2000; Burmester, 1998, Oethinger, 1997*).
- anti-CD8-Antikörper: Wesentlich für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle sind die CD8 Strukturen, welche sich vor allem auf zytotoxischen T-Lymphozyten, aber auch auf Thymozyten und natürlichen Killerzellen befinden (*Abbas, 2000; Burmester, 1998, Oethinger, 1997*).

### 3.4.2. Verwendete Reagenzien und Geräte

Verwendete Reagenzien	Code-Nr.	Firma
<b>ABC-Färbung</b>		
Brückenantikörper: biotinylierter Pferd-anti-Maus IgG (H+L)	BA-2000	VECTOR
Brückenantikörper: biotinylierter Ziege-anti-Maus IgM	BA-2020	VECTOR
Avidin-Biotin-Komplex: Vectorstain ABC-Kit, bestehend aus Lösung A (Avidin) und Lösung B (biotinyliertes Enzym)	PK 6100	VECTOR
3-Amino-9Ethyl-Carbazole (AEC)-Tabletten à 20 mg	A-6926	SIGMA
<b>APAAP-Färbung</b>		
Brückenantikörper: Kaninchen-anti-Maus IgG (absorbiert)	Z25910	DAKO
APAAP-Komplex	D65101	DAKO
Antibody Diluent Verdünnungslösung	S3022	DAKO
Fast Blue BB-Salz	F-3378	SIGMA
5 mM Levamisole	L-9756	SIGMA

Neufuchsin-Substratsystem	K 698	DAKO
<b>Apoptose-Färbung</b>		
Brückenantikörper: Peroxidase-konjugierter Ratte-anti-Maus IgM	04-6820	ZYMED
Formamide	F-7503	SIGMA
Paraformaldehyd	P-6148	SIGMA
Proteinase K	205388	USB

Allgemeine Reagenzien	Firma
Aceton	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
di-Natriumphosphat wasserfrei (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Eosin G (gelblich) für die Mikroskopie	Merck
Essigsäure (96%)	Merck
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG (Charge S0115)
Humanserum Typ AB	PAN Biotech GmbH (Charge P1SO34)
Kaisers Glyceringelatine für Mikroskopie	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	Merck
Methanol	Merck
N, N Dimethylformamid (DMF)	SIGMA
Naphthol-AS-MX-phosphat	SIGMA
Natriumacetat-trihydrat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natronlauge	Merck
Roticlear (Xylolersatz)	Roth
Roti-Histokitt (synthetisches Einschlussmedium)	Roth
Salzsäure 32%	Merck
Saure Hämalunlösung nach Mayer	Apotheke Klinikum Innenstadt
Tissue freezing medium	Jung
Trishydroxymethylaminomethanbase	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Merck
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	Merck

Verbrauchsmaterialien	
1,5ml Safelock-Tubes	Eppendorf

15ml-Röhrchen	Greiner
Cryomold Tissue Tek Intermediate Specimen Molds Volumen 15mm x 15mm x 15mm	Miles Inc. Diagnostics
Deckgläser 24mm x 24mm	Menzel-Gläser
Faltenfilter Durchmesser 240 mm	Schleicher und Schuell
Glasobjektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser
Glaspipetten	
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf

Geräte	
Abzug	Köttermann
diverse Glaskolben, -gefäße und -meßbecher	
Elektronische Präzisionswaage	Kern
Gefrierschrank (-20°C)	Miele
Kryostat-Mikrotom CM 3050S	Leica
Kühlschrank mit Gefriereinheit	Bosch
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer IKA-Combimag RCH mit Heizplatte	Janke und Kunkel
Mikroliterpipetten (0,1 - 1000 µl)	Eppendorf
pH-Meter PHM220	Radiometer
Pipetboy Saugpipette	IBS Integra Biosciences
Vortex-Schüttelgerät	Bender und Hobein AG
Waage R300	Sauter
Wasserbad SW-20C	Julabo

Tab. 3.5.: Daten zu den verwendeten Reagenzien und Geräten

### 3.4.3. Herstellung von Puffern und Lösungen

- **Phosphate buffered saline (PBS):** um 1 Liter 10-fach konzentrierte PBS-Stammlösung mit dem pH 7,2 herzustellen, werden 10,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 90 g NaCl in einem Liter Aqua dest gelöst. Zur Herstellung von 1 Liter Gebrauchslösung werden schließlich 100 ml Stammlösung mit 900 ml Aqua dest. verdünnt.
- **TRIS-Puffer:**
  - 10-fach konzentrierte **TRIS-Stammlösung:** 60,55g Trishydroxymethylaminomethanbase gelöst in 1 Liter Aqua dest. Es erfolgt eine pH-Einstellung auf 7,6 unter Hinzufügen von Salzsäure (HCl) unter pH-Meter-Kontrolle
  - **9%-Kochsalz-Stammlösung:** 87,66 g NaCl pro Liter Aqua dest.

- Für den Ansatz von 1 Liter physiologischer **Gebrauchslösung** werden 100 ml TRIS-Stammlösung, 100ml NaCl-Stammlösung und 800ml Aqua dest. verwendet.
- **Natrium-Acetat-Puffer:** Man verdünnt 5,71 ml 96% Essigsäure (Eisessig) in einem Liter Aqua dest. zu 0,1 normaler Essigsäure. Außerdem sind 13,61 g Natrium-Acetat-Trihydrat in 1 Liter Aqua dest. zu lösen, um die Pufferstammlösung zu erhalten. Schließlich werden 210 ml Essigsäurelösung mit 790 ml Pufferstammlösung zu 1 Liter Gebrauchslösung vermengt.
- **Eosin-Färbelösung:** Zunächst werden 200 ml 0,1% Eosinlösung (verdünnt in Aqua dest) hergestellt. Dazu werden dann zwei Tropfen 96% Essigsäure gegeben. Die entstandene Lösung muss gut gerührt und anschließend 2 mal filtriert werden.
- **AEC-Färbelösung:** Eine 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC) Tablette kommt zur Lösung in 10 ml DMSO und wird dann mit 200 ml Natrium-Acetat-Gebrauchspuffer vermischt. Da bei diesem Vorgang giftige Dämpfe entstehen, sollte er unter dem Abzug durchgeführt werden. Diese Färbelösung muss vor der Anwendung noch filtriert werden.
- **Fast Blue Färbelösung:**
  - Die **Grundlösung** kann vorbereitet und bei 20°C aufbewahrt werden. Hierzu werden 20 mg Naphthol-AS-MX-phosphat in 98 ml TRIS-Puffer gelöst. 2 ml N, N Dimethylformamid werden hierzu gefügt. Nach ausreichendem Rühren kann diese Lösung zu 5 ml Aliquots abgefüllt und eingefroren werden.
  - Die **Gebrauchslösung** muss unmittelbar vor dem Färben angefertigt werden. Hierbei werden zu einem Aliquot 1 mg Fast Blue BB Salz und 5 Tropfen 5 mM Levamisol Lösung hinzugefügt. Nach ausreichendem Schütteln im Vortex Gerät wird die Färbelösung zwei mal filtriert und ist danach gebrauchsfertig.
- **4% Paraformaldehyd-Lösung:** In 100 ml Aqua dest werden 8 g Paraformaldehyd durch Erwärmen gelöst (Flüssigkeit darf nicht kochen) und mit 10 N (normaler) NaOH solange titriert, bis eine klare Lösung entsteht. Mit doppelt konzentriertem PBS wird dann auf 200 ml aufgefüllt.

### **3.5. Färbeprotokolle**

#### **3.5.1. Die HE-Färbung**

##### ***a) Generelle Anmerkungen zur HE-Färbung***

Die HE-Färbung stellt die Standardfärbung in der konventionellen Histologie dar. Da die beiden Farbstoffe Eosin und Hämalaun (saures Hämatoxylin) nacheinander einwirken, spricht man von einer Succadenfärbung. Dabei lagert sich das positiv geladene Hämalaun an die sauren Bestandteile der DNS an und stellt damit die Kernfärbung dar. Es entsteht eine tiefblaue Farbe. Eosin ist negativ geladen und bindet deshalb an positiv geladene Gewebsbestandteile (vor allem Eiweiße). Somit stellt dieser Teil die Plasmafärbung dar. Die Farbe ist blass rot.

##### ***b) Durchführung***

1. Auftauen der Gewebe für 30 Minuten bei Raumtemperatur
2. 10-minütige Acetonfixierung und anschließend Trocknen bei Raumtemperatur für 30 Minuten
3. Wässern der Schnitte in Aqua dest für 5 Minuten
4. Danach werden die OT für 2 bis 4 Minuten in die Hämalaun Lösung gegeben, anschließend 10 Minuten fließend wässern.
5. Im Anschluss 5-minütiges Einwirken der Eosin Färbelösung, sofort danach werden die Gewebeschnitte in Aqua dest gegeben.
6. In einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die OTs entwässert. Zunächst kurzes Eintauchen in 70%ige, dann zweimal in 96%ige Ethanollösung. Danach erst 1 Minute, dann 3 Minuten in 100%igem Ethanol baden.
7. Schließlich werden die Gewebe für zwei mal 15 Minuten in Entwässerungsmedium gegeben (Roticlear oder Xylol).
8. Die somit entwässerten Schnitte können in einem speziellen Eindeckmedium für HE Färbungen eingedeckt werden.

### 3.5.2. Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode

#### a) Generelle Anmerkungen zur ABC-Methode

Als Grundlage dieses Verfahrens dient die Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden, wodurch der sogenannte Avidin-Biotin-Komplex entsteht. Meist lagern sich jedoch weniger als 4 Moleküle Biotin an, so dass am Komplex in der Regel noch Biotin-Bindungsstellen unbesetzt bleiben.

Bei den vorausgehenden Arbeitsschritten dieser Färbemethode wird ein Brückenantikörper verwendet, welcher an seinem Fc-Teil mit Biotin konjugiert ist. An dieses bindet schließlich der Avidin-Biotin-Komplex mit seinen freien Biotin-Bindungsstellen. Schließlich wird ein Chromogen hinzugefügt, welches sich an das Enzym anlagert und präzipitiert. Dadurch kommt es zu einem Farbphänomen an der Stelle des Antigens, dessen Intensität von der Menge des vorhandenen Antigens abhängig ist. Um die angefärbten Strukturen besser in den histologischen Kontext einordnen zu können, findet als letztes noch eine Kerngegenfärbung mit dem bläulichen Farbstoff Hämalaun statt.

Die besonders hohe Empfindlichkeit der ABC-Methode wird durch die starke Affinität zwischen Avidin und Biotin erreicht (Boenisch, 2001; Burmester, 1998). Bei den Färbungen wurde der Färbstoff AEC (rötlich) verwendet.

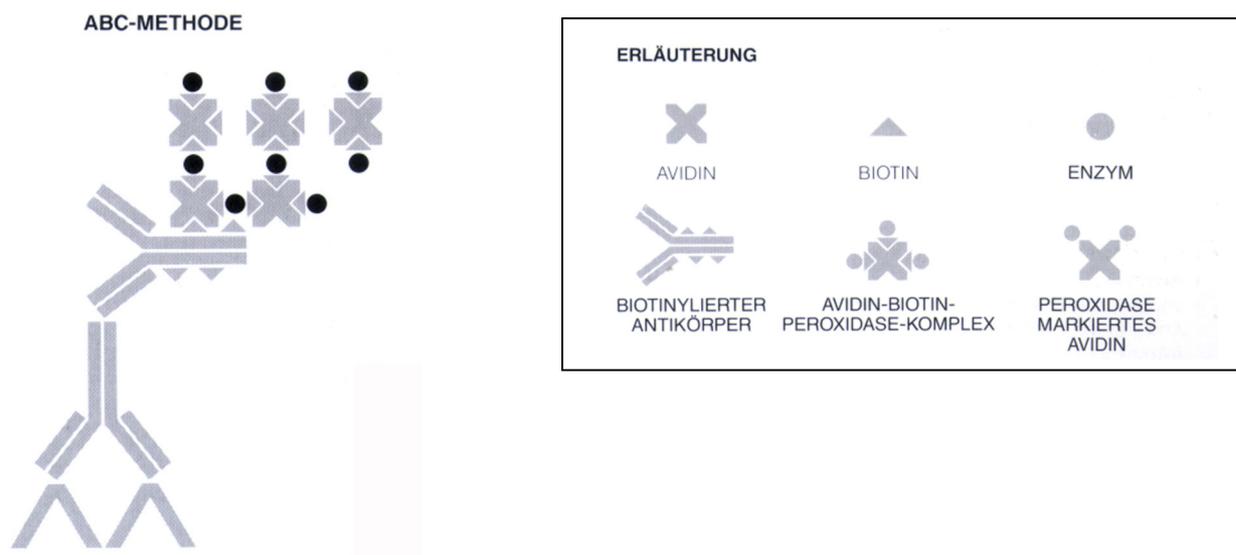


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung des Färbepinzips der ABC-Färbung; Quelle: Boenisch, 2001

**b) Durchführung**

1. Auftauen der Gewebe für 30 Minuten bei Raumtemperatur
2. 10-minütige Acetonfixierung, anschließend 30 Minuten trocknen bei Raumtemperatur
3. Fünf Minuten Spülen in PBS
4. Das 30–minütige Einlegen der OT in eine verdünnte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (500µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml PBS) bewirkt eine Blockierung der sich im Gewebe befindlichen endogenen Peroxidase, die beim späteren Färbeschritt zu einer störenden, unspezifischen Hintergrundfärbung führen kann. Bei diesem Vorgang muss die Küvette mit den OT leicht bewegt werden, um Luftblasen, die bei diesem Arbeitsschritt entstehen, zu entfernen, da sonst die Gefahr besteht, dass es zum Abschwimmen der Gewebe kommt.
5. Fünf Minuten PBS
6. Abblocken von unspezifischen Antikörpern durch Inkubation der OT in jeweils 150µl fetalem Kälberserum (FKS, 1:20 in Aqua dest. verdünnt) für 20 Minuten.
7. Nach dem Abklopfen des FKS wird der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (PBS) aufgetragen, 150 µl pro OT bei einer Inkubationszeit von 1 Stunde. Bei jedem Färbvorgang sollte zur Kontrolle jeweils bei einem OT eine Isotypkontrolle statt dem Primärantikörper aufgetragen werden.
8. Drei Mal 2 Minuten Spülen: hierzu dient eine Lösung aus 0,1% Tween in PBS. Die Beimengung des Detergenziums zu der Pufferlösung führt zu einer Verminderung der Oberflächenspannung auf den OT und erleichtert somit das Aufbringen des Brücken-Antikörpers bzw. des ABC
9. 30-minütiges Bedecken der Schnitte mit dem Brücken-Antikörper: nach 1:500 Verdünnung des Pferd-anti-Maus- bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörpers in 30% AB-Humanserum werden die OT jeweils mit 150µl dieser Lösung für 30 Minuten inkubiert.
10. Drei Mal 2 Minuten Spülen in PBS plus 0,1% Tween
11. Aufbringen des Avidin-Biotin-Komplexes: dieser sollte bereits 30 Minuten vor dem Arbeitsschritt hergestellt werden. Hierzu müssen je 10µl der Komponenten A und B (s.o.) zu 1ml 30% AB-Humanserum gegeben werden. In der halbstündigen Reifungszeit kann sich dann der AB-Komplex ausbilden
12. Drei Mal 2 Minuten Spülen in PBS plus 0,1% Tween

13. Durchführung der Färbung: AEC-Färbelösung : s.o.. Zum Starten des Vorgangs müssen 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben werden, dann kann die Küvette mit den OT für 5 Minuten in die Lösung gegeben werden.
14. Beendigung des Färbevorgangs durch 5-minütiges Wässern in Leitungswasser
15. Kerngegenfärbung mit Hämalaun für 2 bis 4 Minuten, je nach „Frische“ des Hämalauns
16. 10 Minuten fließend Wässern in Leitungswasser
17. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine für Mikroskopie

### **3.5.3. Die APAAP-Methode**

#### ***a) Generelle Anmerkungen zur APAAP-Methode***

Der Vorteil dieser Technik besteht in der Tatsache, dass eine Intensivierung der Reaktionsstärke erreicht werden kann durch wiederholte Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex. Dadurch lagern sich zusätzliche Enzymmoleküle an der Antigenregion an und die Farbstärke wird gesteigert. Cordell et al. beschreiben in ihrem Artikel diese Möglichkeit der Intensitätssteigerung (Cordell, 1984). Die APAAP-Technik wurde in dieser Arbeit nur im Zusammenhang mit Doppelfärbungen angewandt. Der hier zum Einsatz kommende Farbstoff Fast Blue (intensives blau) ist auch bei Einfachfärbungen anwendbar. Er wird von der Firma DAKO bei Doppelfärbungen in Kombination mit AEC (rötlich-braun) wegen des starken Farbkontrastes empfohlen (Boenisch, 2001). Alternativ kann eine DAB Färbung (Diaminobenzidine; braun) im ABC-System mit einer Neufuchsin-Färbung (rosa) im APAAP-System kombiniert werden. In dieser Arbeit wird allerdings nur oben genannte Kombination verwendet.

#### ***b) Durchführung***

1. Wie bei der ABC-Methode wird das Gewebe aufgetaut, Aceton fixiert und getrocknet
2. Aufbringen des Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung (Antibody Diluent), 150 µl pro OT für 1 Stunde
3. Drei Mal 2 Minuten Spülen in TRIS plus 0,1% Tween

4. Inkubation des Brückenantikörpers: Aus 250 µl des Brückenantikörpers mit 625 µl unverdünntem AB-Humanserum und 4125 µl PBS entstehen 5 ml Lösung. Von dieser werden je 150 µl pro OT für 20 Minuten aufpipettiert.
5. Drei Mal 2 Minuten Spülen in TRIS plus 0,1% Tween
6. APAAP-Komplex: 5 ml Lösung bestehen aus 100 µl APAAP-Komplex und 4900 µl PBS, wobei 150 µl pro OT für 20 Minuten einwirken sollen
7. Drei Mal 2 Minuten Spülen in TRIS plus 0,1% Tween
8. Zweimalige Wiederholung der Schritte 4. bis 7. Die Inkubationszeiten bei 4. und 6. betragen nun jeweils 10 statt 20 Minuten
9. Durchführung der Fast Blue Färbung: Von der frisch zubereiteten Färbelösung (s.o.) werden pro OT 150 µl aufpipettiert bei 5 Minuten Einwirkzeit.
10. 2 Minuten Spülen in TRIS Plus 0,1% Tween
11. Kerngegenfärbung mit Hämalaun für lediglich 10 Sekunden, damit nur eine leichte graublau Gegenfärbung entsteht, so dass diese noch deutlich von der intensiv blauen Fast Blue Färbung abzugrenzen ist
12. 10 Minuten fließend Wässern in Leitungswasser
13. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine für Mikroskopie

**Anmerkung:** Zur Unterdrückung der endogenen Phosphatase im Gewebe ist hier kein eigener Arbeitsschritt nötig, da die Blockierungssubstanz Levamisol dem Färbereagensatz zugesetzt wird und dadurch eine ausreichende Hemmung möglich ist (*Boenisch, 2001*).

### 3.5.4. Doppelfärbungen

#### *a) Generelle Anmerkungen zu Doppelfärbungen*

Bei der Charakterisierung von Zelleigenschaften mittels immunhistologischer Methoden ergeben sich gelegentlich Fragestellungen, bei denen auf einer Zelle zwei verschiedene Antigene nachgewiesen werden sollen, zum Beispiel ob eine CD4 positive Zelle auch CCR5 exprimiert. Dies nennt man Kolo-kalisation oder Koexpression zweier Antigene. Hier bieten sich prinzipiell mehrere Möglichkeiten an:

Einerseits kann man Serienschnitte, welche beim Schneidevorgang direkt aufeinander folgten, sogenannte Konsekutivschnitte, verwenden. Bei der entsprechenden Schnittdicke kann man davon ausgehen, dass auf den benachbarten Schnitten größtenteils die selben Zellen vorhanden sind. Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass man bei der Auswertung die beiden OTs nacheinander im Mikroskop betrachten muss und somit eine Verwechslungsmöglichkeit zwischen den einzelnen angefärbten Zellen besteht. Außerdem ist diese Methode sehr arbeitsaufwendig.

Als Alternative bietet sich die Anfertigung von Doppelfärbungen an. Hierbei werden auf einem Schnitt unter Einsatz unterschiedlicher Farben zwei Antigene gleichzeitig nachgewiesen. Dazu müssen zwei verschiedene immunhistochemische Detektionssysteme verwendet werden, die keine Kreuzreaktivität zeigen. Beispielsweise kann der erste Primärantikörper in der ABC-, der zweite in der APAAP- Methode nachgewiesen werden. Diese Kombinationsmöglichkeit der beiden Techniken wird von Mason et al. erläutert. Man kann dadurch auf einem Schnitt ohne komplizierte Vergleichsmethoden Antigenkoexpression nachweisen (*Mason, 1978*). Daneben sollten zwei verschieden Chromogene eingesetzt werden, die einen deutlichen Farbkontrast aufweisen und eine Unterscheidung von Mischfarben im Falle einer Kolo-kalisation und der einzelnen Farben gestatten (*van der Loos 1999*). In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe AEC und Fast Blue verwendet. Als Nachteil wäre hier allerdings anzumerken, dass die Antigene oft räumlich dicht nebeneinander liegen und es deshalb zu gegebenenfalls unklaren Überschneidungen in den Farbphänomenen kommt, was zu Ungenauigkeiten in der Auswertung führen kann. In Vorversuchen wurden außerdem die Farbstoffe DAB (braun) und Neufuchsin (rosa) kombiniert. So konnten die Ergebnisse beider Farbkombinationen miteinander verglichen werden. Im Endeffekt wurde allerdings die AEC – Fast blue Methode zur Auswertung erwählt. Hierbei war zu beachten, dass die Kerngegenfärbung mit Hämalaun nur sehr kurz stattfinden muss, damit sich ein erkennbarer Kontrast gegen den Fast Blue Farbstoff einstellt. Die Kerngegenfärbung weg zu lassen stellt dahingegen keine Alternative dar, da sie einerseits der Darstellung der Morphologie dient, andererseits auch nur so Zellen identifiziert werden können, welche weder mit AEC noch mit Fast Blue angefärbt sind.

Als dritte Möglichkeit zur Darstellung von Antigenkolo-kalisation steht noch die direkte Immunfluoreszenz zur Verfügung. Auch hier ist eine Doppelfärbung (sogar

Mehrfachfärbung) möglich unter Verwendung von zwei oder mehr verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Färbungen sind möglich von Zellen in Suspension, Gewebeschnitten und Zytocentrifugen-Präparaten (sog. Zytospins) (*Burmester, 1998*).

In dieser Arbeit wurden Doppelfärbungen zu einer Fragestellung angefertigt:

Die Koexpression von CCR5 und CD4 sollte nachgewiesen werden, um Aussagen über das Vorliegen einer Th1 Antwort treffen zu können. Als allgemeine Vorgehensweise bei Doppelfärbungen gilt, dass jenes Antigen, welches von der Mehrheit der Zellen exprimiert wird, mit dem weniger intensiven Farbstoff (hier Fast blue) dargestellt werden sollte. Das seltener exprimierte Antigen wird entsprechend in der kräftigeren Farbe (hier AEC) dargestellt (*Boenisch, 2001*). Zu diesem Zweck wurden zuerst die Einfachfärbungen der einzelnen Antigene betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass der Oberflächenmarker CD4 häufiger exprimiert wird als CCR5. Daher wurde bei der Doppelfärbung nach folgendem Modus vorgegangen.

Koexpression von **CD4** mit **CCR5**:

- erster Primärantikörper: anti-CCR5 (ABC-Färbung; Chromogen AEC)
- zweiter Primärantikörper: anti-CD4 (APAAP-Färbung; Chromogen Fast Blue)

Prinzipiell ist es sinnvoll, Primärantikörper von verschiedenen Spezies auszuwählen, um Kreuzreaktionen der beiden Brückenantikörper zu vermeiden. Sollte dies beispielsweise aufgrund von Nichtverfügbarkeit einer solchen Kombination nicht möglich sein, müssen spezielle Kontrollfärbungen zum Ausschluss von Kreuzreaktionen durchgeführt werden (s. Kapitel 3.6.2.).

### ***b) Durchführung***

Das erste Antigen wurde mit der ABC Technik nachgewiesen:

1. Nach Auftauen, Acetonfixierung und Lufttrocknung wurden die Gewebeschnitte in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung gegeben, um die endogene Peroxidase zu blockieren.
2. Anschließend Inkubation in humanem AB Serum (1:20 Verdünnung in Aqua dest) zum Abblocken unspezifischer Antikörper

3. Auftragen des Primärantikörpers (anti-CCR5) in entsprechender Verdünnung für 1 Stunde
4. Nacheinander Inkubation des Brückenantikörpers und des Avidin-Biotin-Komplexes nach zwischengeschalteten Waschschritten (s. Protokoll der ABC-Färbung)
5. Durchführung einer AEC Färbung, dann fließend wässern für 10 Minuten und 10 Minuten in TRIS Puffer geben.

Das zweite Antigen wird in der APAAP Technik nachgewiesen

6. Im Anschluss wurde direkt der zweite Primärantikörper (anti-CD4) in entsprechender Verdünnung aufgetragen.
7. Nach entsprechender Inkubationszeit und Waschen in TRIS Puffer nacheinander Aufbringen des Brückenantikörpers und des APAAP Komplexes für jeweils 20 Minuten in der jeweiligen Verdünnung
8. Zweimalige Wiederholung des letzten Färbeschrittes entsprechend dem oben bereits genannten Färbeprotokoll.
9. Durchführung einer Fast Blue Färbung
10. Kerngegenfärbung mit Hämalaun für 10 Sekunden, fließend wässern und schließlich Eindecken der Gewebeschnitte in Kaisers Glycingelatine.

Anmerkung: Bei jeder Doppelfärbung wurden auch wieder Isotypkontrollen durchgeführt. Außerdem laufen parallel immer auch die jeweiligen Einzelfärbungen. Dadurch kann man bei unklaren Ergebnissen in der Doppelfärbung das Ergebnis mit den jeweiligen Einzelfärbungen vergleichen. Des weiteren fand auch bei jeder Färbeserie eine Kontrollfärbung zum Ausschluss von Kreuzreaktionen statt. Diese Kontrollfärbung ist im Kapitel *Kontrollen* dargestellt.

### 3.5.5. Nachweismethoden der Apoptose

#### 3.5.5.1. Verwendung von Mab gegen ssDNA (F7-26)

##### a) Generelle Anmerkungen zur Methode:

Eine Möglichkeit zum Nachweis von Apoptose ist die Erfassung der typischen morphologischen Zellveränderungen in der Licht- und Elektronenmikroskopie. Die gängige immunhistologische Technik stellt das TUNEL-Assay (transferase mediated uridine nick end labeling) dar (*Iseki, 1986*). Neueren Veröffentlichungen zu Folge ist aber dieses Verfahren, bei welchem 3'-OH-Gruppen an den für Apoptose typischen DNA-Brüchen dargestellt werden, nicht ausreichend genau (*Frankfurt, 1996; Frankfurt, 2001*). Auch nekrotische Zellen können DNA-Brüche aufweisen und werden somit durch das TUNEL-Assay als falsch positiv dargestellt. In frühen Phasen der Apoptose, in denen noch keine Fragmentierung der DNA stattgefunden hat, führt diese Methode zu einem falsch negativen Ergebnis.

Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Einzelstrang-DNA (ssDNA) nutzt man die Tatsache, dass die DNA einer apoptotischen Zelle empfindlicher gegenüber Erhitzung wird. Grund hierfür ist die bereits frühapoptisch eintretende Deacetylierung der basischen Kernproteine, sogenannter Histone, deren Aufgabe die DNA-Stabilisierung darstellt. Die Erwärmung der Gewebeschnitte in Formamidlösung bietet den Vorteil, dass auch niedrigere Temperaturen dazu ausreichen, eine langstreckige Trennung der Doppelstränge herbeizuführen. Bei höheren Temperaturen könnte diese Technik, zumindest an Gefrierschnitten, nicht durchgeführt werden, da es dann zu einer Zerstörung von Strukturen käme. Monoklonale Antikörper gegen ssDNA können nur binden, wenn der Einzelstrang über eine längere Distanz vorliegt, wodurch ausgeschlossen wird, dass es zu einer Interaktion mit den kurzen Einzelstrangstrecken kommt, welche beispielsweise bei einer DNA-Fragmentierung entstehen, die, wie bereits erwähnt, nicht absolut spezifisch für Apoptose ist. Stärker wirksame denaturierende Substanzen (z.B. HCl) sollten nicht eingesetzt werden, da sie auch nekrotische Zellen beeinflussen.

Im wesentlichen kann man sagen, dass Mab gegen ssDNA eine spezifische und sensitive Möglichkeit darstellen, Apoptose auch schon in einem frühen Stadium nachzuweisen und dem TUNEL in mancher Hinsicht überlegen sind (*Frankfurt, 1996; Frankfurt, 2001; Korkolopoulou, 2001*).

**b) Durchführung**

1. Nach dem Auftauen (s.o.) müssen die Gewebe in 4% Paraformaldehyd 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert werden
2. Zwei Mal 2 Minuten in PBS Spülen
3. Schnitte werden für 30 Minuten in 85% Methanollösung (mit Aqua dest. verdünnt) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet
4. In diesem Färbeverfahren ist eine Andauung des Gewebes notwendig: hierzu dient Proteinase K Lösung (20µg/ml PBS), welche 20 Minuten einwirken muß
5. Drei Mal zwei Minuten in PBS Spülen
6. Die Objektträger werden für 20 Minuten in eine 50% Formamidlösung (50% Formamide, 50% Aqua dest.) gegeben, welche im Wasserbad auf 56°C vorgeheizt ist, und anschließend in eiskaltem PBS für 5 Minuten abgekühlt
7. Entsprechend der ABC Methode ist es erforderlich, die endogene Peroxidase im Gewebe zu blockieren, wobei hierfür 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Anwendung kommt
8. Zwei Mal 2 Minuten in PBS Spülen
9. Unspezifische Antikörper werden mit 3% BSA verdünnt in Aqua dest bei einer Einwirkzeit von 15 Minuten abgeblockt
10. Zwei Mal 2 Minuten in PBS Spülen
11. Auftragen von 100 µl des Primärantikörpers in der oben beschriebenen Verdünnung für 15 Minuten
12. Zwei Mal 2 Minuten in PBS Spülen
13. Als Brückenantikörper dient ein Ratte-anti-Maus IgM Antikörper, welcher 20 Minuten inkubieren soll. Der Antikörper wird in der 1:500 Verdünnung in 30% AB-Humanserum angewandt
14. Zwei Mal 2 Minuten in PBS Spülen
15. Durchführung einer AEC-Färbung (s.o.), mit dem Unterschied, dass hier die Inkubationszeit bis zu 20 Minuten beträgt. Mikroskopische Kontrollen der bereits erreichten Farbintensität sollten alle 5 Minuten durchgeführt werden
16. Kerngegenfärbung mit Hämalaun, Wässern und Eindecken (s.o.)

### ***3.5.5.2. Nachweis von Fas Rezeptor- und Fas Ligand Expression***

Die Moleküle Fas Rezeptor und Fas Ligand wurden bereits im Kapitel 2.4.3 vorgestellt. Die Interaktion der beiden Rezeptoren führt letztendlich zur Apoptose der FasR tragenden Zelle. Dadurch hat der Nachweis beider Strukturen eine gewisse Bedeutung bei der Beschreibung der Apoptoseaktivität in einem Gewebe, da ein gleichzeitiges Vorkommen einen Hinweis auf mögliche Zelltodinduktion liefert.

Verwendet wurde in diesem Fall monoklonale Antikörper gegen Fas und Fas Ligand, die in der oben beschriebenen ABC-Technik als Primärantikörper zum Einsatz kamen.

## **3.6. Kontrollen**

Die Überprüfung der Reagenzien und der Arbeitsschritte sind bei der Beurteilung von immunhistologischen Resultaten notwendig. Hierzu wurden die unten beschriebenen Kontrollen durchgeführt (*gemäß Boenisch, 2001*).

### **3.6.1. Positivkontrollen**

Als Positivkontrollen wurden in einer Färbeserie stichprobenartig Gewebe mitgefärbt, von denen ein hoher Gehalt an entsprechendem Antigen bereits aus Vorversuchen bekannt war. Beispielsweise dienen Gefrierschnitte von Tonsillae palatinae oder Leukozyten-Zytospins (Zytozentrifungen-Präparat) als Kontrollmaterial.

### **3.6.2. Negativkontrollen**

Negativkontrollen sollen eine Differenzierung von spezifischen Farbergebnissen und unspezifischer Hintergrundaktivität ermöglichen. Letztere entsteht vor allem durch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen zwischen Gewebeproteinen und Antikörpermolekülen, durch endogene Enzymaktivitäten der Gewebeproben, insbesondere der endogenen Peroxidase. Diese findet sich im Hämoglobin der Erythrozyten, im Myoglobin der Muskelzellen und in Zytochromen von Granulozyten und Makrophagen (*Boenisch, 2001*). Der Vergleich dieser Negativkontrollen mit den

Primärantikörper-inkubierten Gewebeschnitten half bei der Auswertung, unspezifische Hintergrundaktivität von spezifischer Antigen-Antikörper-Interaktion abzugrenzen.

Als Negativkontrolle wurde bei jedem Färbevorgang für jedes zu färbende Gewebe jeweils ein Schnitt mitverarbeitet, der statt mit dem spezifischen Primärantikörper mit einem unspezifischen Antikörper des selben Isotyps (Isotypkontrolle) inkubiert wurde, in dieser Arbeit also IgG1 bzw. IgM Antikörper. In den Gewebeschnitten finden sich zum Teil auch Zellen, welche Fc-Rezeptoren tragen, beispielsweise Monozyten. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass der verwendete Primärantikörper unspezifisch an diese Fc- Rezeptoren bindet und somit eine Färbung an Zellen ermöglicht unabhängig vom Vorhandensein des gesuchten Antigens (unspezifische Färbung). Verhindert werden soll dieses Phänomen durch die Verwendung von Blockersubstanzen, wie in den Einzelfärbungen FKS und in den Doppelfärbungen humanem AB-Serum. Zur Kontrolle wurden dann in jeder Färbeserie Isotypenkontrollen durchgeführt, um zu zeigen, dass eine unspezifische Färbung durch die Blockersubstanz erfolgreich unterdrückt werden konnte. Die Färbeserie ist dann in Ordnung, wenn bei der Isotypkontrolle keine Färbung auftritt, also keine unspezifische Bindung stattgefunden hat (*Boenisch, 2001*).

Bei den Doppelfärbungen wurden ebenfalls Isotypkontrollen durchgeführt, wobei diese jeweils getrennt für beide Primärantikörper stattfanden. Es wurde lediglich der eine Primärantikörper durch die Isotypkontrolle ersetzt, wobei die Doppelfärbung ansonsten nach oben genanntem Protokoll ausgeführt wurde. In den entsprechenden Ergebnissen sollte sich dann nur das Farbphänomen des anderen verwendeten monoklonalen Antikörpers darstellen und die Isotypkontrolle durfte keine Färbung verursachen (Ergebnis wie bei einer Einfachfärbung). Daneben musste ausgeschlossen werden, dass eine Kreuzreaktivität der beiden Brückenantikörper stattfindet. Hierzu wurde bei jeder Doppelfärbeserie zusätzlich folgender Versuch gemacht:

Durchführung der ABC Methode nach oben genanntem Protokoll bis einschließlich der Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Primärantikörper: anti-CCR5). Die Färbung mit AEC wurde nicht durchgeführt. Stattdessen wurde das Experiment weitergeführt, indem sofort der Brückenantikörper der APAAP Färbung aufgetragen wurde (kein zweiter Primärantikörper vorher). Nach Inkubation des APPAP Komplexes fand schließlich eine Neufuchsin Färbung statt. Wenn der zweite

Brückenantikörper nicht an den ersten Primärantikörper gebunden hat, so lässt sich hierbei kein Farbphänomen entwickeln. Sollte sich trotzdem eine spezifische rote Färbung zeigen, muss die Färbung ausgeschlossen werden.

### **3.7. Etablierung der Färbemethoden**

Generell dienten als Protokollvorlagen für die Methoden dieser Doktorarbeit die „Handbücher I und II immunchemischer Färbemethode“ der Firma DAKO (*Boenisch, 2001*), die Broschüre „Immunenzytische Doppelfärbungen: Eine praktische Anleitung“ (*van der Loos, 1999*) ebenfalls der Firma DAKO sowie die entsprechenden Angaben der Hersteller von Primärantikörpern und anderer Reagenzien. Daneben wurden persönliche Beobachtungen und Austestungen der Methoden mit einbezogen. Außerdem fanden zu unterschiedlichen Arbeitsschritten auch Rücksprachen mit korrespondierenden Labors und dem Immunhistologielabor der dermatologischen Klinik statt. Im Vorfeld der eigentlichen Färbeserien wurden anhand von Testgeweben zahlreiche Probefärbungen durchgeführt. Durch diverse Variationen von Konzentrationen und Inkubationszeiten der Antikörper und Veränderungen der Färbezeiten wurden die Protokolle für die jeweils angewandte Technik optimiert. Speziell im Rahmen der Doppelfärbungen fanden ausgedehntere Vorversuche statt. So wurde die Anzahl der APAAP-Färbeschritte variiert, versuchsweise die am ersten Tag verwendeten Antikörper mit den am zweiten Tag verwendeten vertauscht, verschiedene Farbstoff- und Antikörperkombinationen ausgetestet und die Gegenfärbung mit Hämalaun zeitlich variiert. In der Doppelfärbung hat sich die auch von der Firma DAKO empfohlene Kombination des rötlich-bräunlichen AEC-Farbstoffes mit dem blauen Fast Blue als günstig herauskristallisiert, da eine Differenzierung der angefärbten Strukturen hierbei recht deutlich war. Bei der Gegenfärbung mit Hämalaun musste allerdings die Zeit auf wenige Sekunden verkürzt werden, um nur eine schwache blass-blaue Darstellung der Zellkerne zu bewirken. Ansonsten wäre die Abgrenzung zum Fast Blue zu ungenau und die Interpretierbarkeit wäre eingeschränkt. In Vorversuchen wurde auch die Farbstoffkombination DAB mit Neufuchsin getestet. Die Ergebnisse dienten auch als Kontrolle der durchgeführten Doppelfärbungen. Die endgültigen Auswertungen fanden allerdings allesamt an den AEC / Fast Blue-gefärbten Präparaten statt.

Alle OTs wurden nach dem Eindecken der Gewebe mit Glyceringelatine zunächst einen Tag luftgetrocknet. Danach hat es sich als günstig herausgestellt, die Ränder des Deckglases mit farblosem Nagellack zu versiegeln, um ein nachträgliches Eindringen von Luft zu verhindern, wodurch Interpretation und Fotografie der Präparate erheblich eingeschränkt wären. Außerdem erschien eine zeitnahe mikroskopische Auswertung der Gewebe sinnvoll, da es trotz lichtgeschützter Aufbewahrung der OTs nach einer gewissen Lagerungszeit zu einem Abblässen der Farbphänomene kommen kann.

### 3.8. Auswertungsverfahren

**Vorbemerkung:** Die anhand von Biopsiematerialien durchgeführten Untersuchungen bedingten ein relativ kleines Patientengut: 10 Patienten mit und 5 Patienten ohne Ekzemreaktion im Nickel-Epikutantestareal, sowie 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris. Der Auswertungsmodus und die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde nach Beratung und unter Absprache mit Herrn Dr. Strobl vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München erarbeitet. Dementsprechend können quantitative und qualitative Bewertungskriterien der Immunhistologie zwar aufgelistet, aber auf Grund der begrenzten Fallzahl nur beschränkt statistisch ausgewertet werden. Nach Rücksprache mit Herrn Dr. Strobl sind zwei Möglichkeiten der Auswertung möglich: Einerseits kann eine semiquantitative Darstellung der Ergebnisse erfolgen, diese ist allerdings ungenau. Exakter ist hingegen die Auflistung der Ergebnisse in Prozent, wobei der relative Anteil der angefärbten Zellen innerhalb eines betrachteten Zellkollektivs (beispielsweise der Epidermis) angegeben wird. Anschließend kann der arithmetische Mittelwert errechnet werden. Es sollte zusätzlich noch der Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Ergebnisserie angegeben werden. Bei den Doppelfärbungen wurden die Ergebnisse in einer Vier-Felder-Tafel angegeben nach folgendem Schema:

Patient Nr.	CCR5+	CCR5-
<b>CD4+</b>	CD4+ CCR5+	CD4+ CCR5-
<b>CD4-</b>	CD4- CCR5+	CD4- CCR5-

Bezüglich der doppelpositiven Ergebnisse (CD4+ CCR5+) wurden auch arithmetischer Mittelwert berechnet.

Die Auswertung der einzelnen Präparate fand am Lichtmikroskop in einer 500-fachen Vergrößerung statt. Es wurden mindestens zwei Schnitte pro gefärbtem Antikörper evaluiert. Als positiv wurden Zellen gewertet, deren Kern eindeutig zu identifizieren war und die eine deutliche braun-rötliche Färbung aufwiesen. Bei den Doppelfärbungen galten jene Zellen als doppelt positiv, deren Zellkern sichtbar war und die sowohl den rötlich-braunen als auch den blauen Farbton aufwiesen. Da in den Doppelfärbungen ausschließlich Oberflächenmoleküle dargestellt wurden, war die Auswertung aufgrund der Koexpression der Epitope und der daraus resultierenden Überschneidungen der Farbphänomene teilweise schwierig.

Bei jeder Färbung wurden 3 Gesichtsfelder beurteilt, wobei repräsentative Bereiche innerhalb der Schnitte ausgewählt wurden. Zum Erreichen eines Objektivitätsgrades fanden zwei zeitlich getrennte Evaluationen der Gewebe durch zwei unabhängige Beobachter statt. Die Ergebnisse wurden anschließend miteinander verrechnet.

Zunächst wurden die HE Färbungen ausgewertet. Hierbei konnte eine histologische Beurteilung der Gewebe stattfinden, die Ausprägung und Zusammensetzung des Infiltrats beurteilt sowie die Veränderungen in der Epidermis beschrieben werden. Anschließend wurden die Kontrollfärbungen ausgewertet. Dies diente dem Ausschluss von artefiziellen, unspezifischen Farbphänomenen.

Im Folgenden wurden die Einzel- und zum Schluss die Doppelfärbungen begutachtet: Beim Großteil der Auswertung wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde ein repräsentativer Ausschnitt innerhalb des Schnitts ausgewählt. Dann wurden in einer 500-fachen Vergrößerung erst alle dargestellten Zellen (sichtbarer Zellkern) unter Zuhilfenahme eines 100 Quadranten Zählrasters ausgezählt. Im Anschluss wurden die angefärbten Zellen ausgezählt. Schließlich wurde der Quotient aus angefärbten Zellen und Gesamtzahl der Zellen gebildet und mit 100 multipliziert. Hierbei ergab sich der entsprechende prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellen am Gesamtzellbestand. Danach wurde dieser Vorgang anhand von 2 weiteren Gesichtsfeldern wiederholt und vom zweiten Gutachter ebenfalls durchgeführt. Schließlich konnte der Mittelwert aus den gewonnenen Prozentwerten als endgültiges Ergebnis angegeben werden (gerundet, ohne

Dezimalstelle). Zum Schluss wurde noch der arithmetische Mittelwert aller Ergebnisse einer Färbeserie angegeben.

Bei den Markern Ki-67, FasR, FasL und bei der Darstellung der apoptotischen Zellen wurde analog verfahren, allerdings wurden in diesen Fällen separate Beurteilungen einerseits der angefärbten Zellen des Infiltrats in der Dermis, andererseits der angefärbten Zellen innerhalb der Epidermis durchgeführt.

Die Marker ICAM-1 und E-Selektin werden auf Endothelien exprimiert. Daher können hierbei keine Auszählungen stattfinden. Vielmehr wurde rein deskriptiv die Expression dieser beiden Marker beschrieben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Histologische Beschreibung der Gewebeproben

Zunächst fand eine histologische Begutachtung der HE Färbungen der Probebiopsien aus den Ekzemarealen beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem statt. In der Regel zeigte die Epidermis eine fokal lymphozytäre Exozytose und stellenweise Ausbildung einer Spongiose. Ausnahmen bildeten die Proben X3, X9 und X11. Hier waren zusätzlich unregelmäßige Akanthosen der Epidermis mit fokalen Parakeratosen des Stratum corneums zu sehen. Spongiose und Lymphozytenexozytose waren in diesen Proben sehr deutlich ausgeprägt. Im oberen und mittleren Korium waren in allen Proben perivaskuläre lymphohistiozytäre Infiltrate in jeweils unterschiedlicher Ausprägung nachzuweisen. Vereinzelt konnten eosinophile Granulozyten (X2, X3, X6, X7, X8, X11) und neutrophile Granulozyten (X1, X11, X15) gesehen werden.

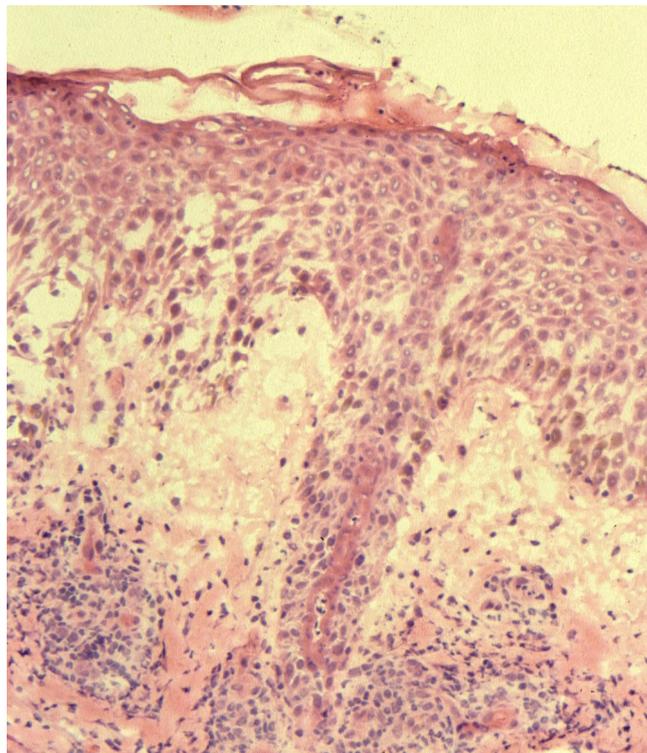
In der histologischen Beschreibung der HE Färbungen der Biopsien aus den klinisch reaktionslosen ECT-Arealen zeigte sich immer eine unauffällige Epidermis. Perivaskulär waren diskrete lymphozytäre Infiltrate mit vereinzelt Makrophagen sichtbar.

Schließlich wurden auch die Psoriasisproben histologisch untersucht. Es zeigten sich in den HE Färbungen die für die Psoriasis vulgaris typischen verlängerten und birnenförmig aufgetriebenen Reteleisten im Sinne einer Akanthose. Stellenweise war eine Parakeratose nachweisbar. Die Kapillaren im Stratum papillare waren dilatiert. Es finden sich deutliche perivaskuläre Infiltrate aus hauptsächlich Lymphozyten, aber auch Makrophagen und vereinzelt neutrophilen Granulozyten. Vereinzelt war eine leukozytäre Exozytose zu beobachten.

Anmerkung: An Gefrierschnitten lassen sich die morphologischen Strukturen weniger exakt darstellen als an Paraffinschnitten. Bei allen Probeentnahmen am Patienten wurden zwei Stanzbiopsien aus demselben ECT Feld entnommen. Eine der Proben wurde kryokonserviert. Die andere wurde in Formalin eingelegt. Von dieser Probe

wurden Paraffinschnitte angefertigt, welche nach einer HE Färbung histopathologisch von der Abteilung für Histologie der Dermatologischen Klinik der LMU begutachtet wurden. Die Ergebnisse dieser Gutachten wurden mit den Ergebnissen der HE Färbung der Kryostatschnitte verglichen.

Folgendes Foto zeigt die HE Färbung einer Probe bei einem Patienten mit Nickel-induziertem Kontaktekzem. Die morphologischen Strukturen lassen sich bei Gefrierschnitten nicht so exakt darstellen wie bei Paraffinschnitten.



**Abb. 4.1.:** HE-Färbung einer Gewebeprobe von einem Patienten mit Nickel-induziertem allergischen Kontaktekzem. Vergrößerung: 200-fach. Es zeigen sich perivaskuläre dermale Zellinfiltrate sowie eine beginnende Spongiose.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen tabellarisch aufgelistet. Im Anschluss dienen Grafiken und Fotografien der Verdeutlichung der Ergebnisse.

## 4.2. Subtypenverteilung im T-Zellinfiltrat

### 4.2.1. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten mit Nickelallergie

Tabelle 4.1. zeigt die Ergebnisse der Auswertung der immunhistologischen Färbungen zur Charakterisierung des lymphozytären Infiltrats beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem.

Patient	CD 3	CD4	CD8
X1	92%	63%	31%
X2	82%	74%	8%
X3	84%	49%	37%
X5	79%	68%	11%
X6	61%	52%	12%
X7	61%	34%	25%
X8	87%	64%	24%
X9	64%	54%	13%
X11	91%	83%	11%
X15	79%	66%	13%

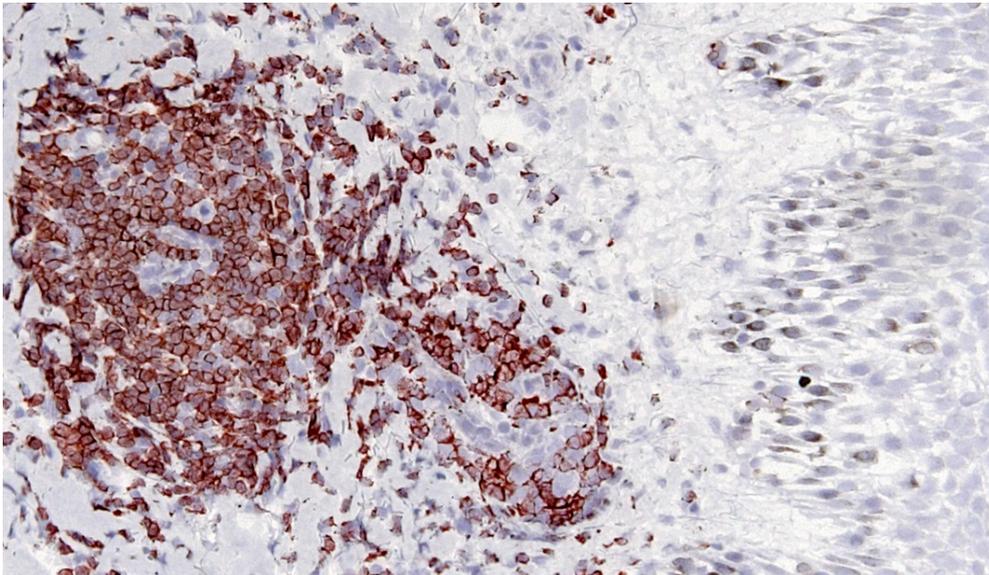
<b>Mittelwert</b>	78%	61%	19%
<b>Min / Max</b>	61 - 92	34 - 83	08 - 37

**Tab. 4.1.:** Expression von T-Zellmarkern bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie; es wird jeweils der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen vom gesamten Zellbestand innerhalb des Infiltrats angegeben; Abkürzungen: Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Die Daten lassen erkennen, dass meist ein dichtes T-Zellinfiltrat vorherrscht. Im Durchschnitt waren 78% der Zellen im Infiltrat CD3+, wobei in einer Probe der Anteil sogar 92% betrug, allerdings auch in zwei Proben nur 61% beschrieben werden konnten. Auffällig war bei der Auswertung, dass vor allem die Proben, bei denen der prozentuale Anteil der CD3+ Zellen niedriger war (X6, X7, X9) auch in der HE Färbung ein eher schwächer ausgeprägtes Infiltrat zeigten. Dagegen war die

Ausprägung des Infiltrats in den Proben X2, X3 und X11 sehr stark und hier zeigte sich auch ein hoher prozentualer CD3+ Anteil.

In der Epidermis konnten vereinzelt CD3+ Zellen gefunden werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um T-Lymphozyten, welche im Rahmen der Entzündungsreaktion in die Epithelschicht vorgedrungen sind. Vermehrt war dieses Phänomen in den Proben X3, X9 und X11 zu sehen.



**Abb. 4.2.:** Immunhistologische Darstellung der CD3+ T-Zellen innerhalb des dermalen Infiltrats bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-CD3; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 100-fach

Die weitere Differenzierung der T-Zellen zeigte ein mit 61% deutliches Überwiegen der CD4+ Zellen. Der Anteil der CD8+ Zellen konnte im Durchschnitt nur mit 19% angegeben werden. Die Summe aus CD4+ und CD8+ ist mit 80% etwas größer als der Anteil der CD3+ Zellen. Als mögliche Erklärungen sind eine geringe Messungengenauigkeit, Effekte des Rundens der Ergebnisse und die CD4 Expression auch auf anderen Zellen heranzuziehen. So befindet sich der Oberflächenmarker CD4 zwar hauptsächlich auf T-Helferzellen (CD3+ CD4+), aber auch auf Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten. CD8 wird vor allem von zytotoxischen T-Zellen (CD3+ CD8+) exprimiert, allerdings auch von natürlichen Killerzellen (Abbas, 2000; Burmester, 1998). Um das Rechenbeispiel zu vereinfachen, wird zunächst der Fall angenommen, dass es sich bei den CD4+ Zellen nur um T-Helferzellen (CD3+ CD4+) und bei CD8+ Zellen nur um zytotoxische T-Zellen (CD3+ CD8+) handelt. Dann wäre der Anteil der CD4+ Zellen an der

Gesamtmenge der T-Lymphozyten 78% (entspricht 61:78). Der relative Anteil der CD8+ Zellen wäre in dem vereinfachten Beispiel dann 24% (entspricht 19:78). In der Realität sind diese Anteile wahrscheinlich etwas kleiner, da es auch einige CD3- CD4+ und CD3- CD8+ Zellen gibt. Trotz allem kann man sagen, dass das Zellinfiltrat von CD3+ CD4+ Zellen dominiert wird. Eine Ausnahme bilden die Proben X3 und X7. Hier sind die Verteilungen mit CD4+ 48% zu CD8+ 37% bzw. CD4+ 34% zu CD8+ 28% relativ ausgeglichen.

**Fazit:** In der Regel liegt beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem ein CD3+ T-Zell dominiertes Infiltrat vor, welches sich zu einem Großteil aus CD4+ Zellen und zu einem kleineren Teil aus CD8+ Zellen zusammensetzt.

#### **4.2.2. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten ohne Nickelallergie**

Als Vergleichsgewebe wurden Hautbezirke ausgewählt, die genau wie die vorher untersuchten Stenzen aus den Arealen eines mit Nickelsulfat durchgeführten ECT stammten, nur dass in diesen Fällen keine klinische Reaktion nach der 48-stündigen Provokation festzustellen war. Bei diesen Personen war auch anamnestisch keine Nickelkontaktallergie eruierbar. Der Unterschied dieser Gewebe zu gesunden Hautbezirken, die nicht einem ECT unterzogen wurden, liegt darin, dass hier ein intensiver Kontakt zu dem Metall bestand. Hiermit sollte vor allem der Fragestellung nachgegangen werden, ob die beobachteten Phänomene bei den nickelallergischen Probanden lediglich aufgrund der spezifischen allergischen Entzündungsreaktion aufgetreten waren, oder ob vielleicht ein unspezifisch-toxischer Effekt des Nickelmetalls auch einen Beitrag zur Entstehung bestimmter Veränderungen leistete. Daher mussten für die hier bestehenden Fragestellungen diese speziellen Kontrollgewebe verwendet werden und nicht Hautstanzen aus unstimulierter gesunder Haut. Die erhobenen Ergebnisse sind in folgender Übersichtstabelle dargestellt:

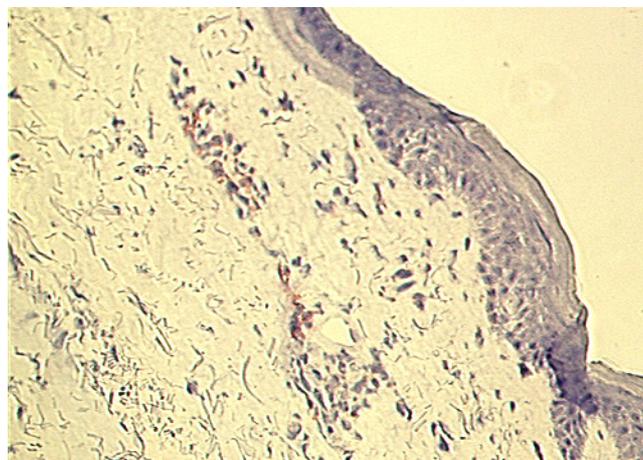
Patient	CD 3	CD4	CD8
<b>A39</b>	62%	55%	5%
<b>A40</b>	71%	49%	21%
<b>A43</b>	59%	43%	18%
<b>A44</b>	58%	30%	25%
<b>A60</b>	90%	62%	26%

<b>Mittelwert</b>	68%	48%	19%
<b>Min / Max</b>	58 - 90	30 - 62	5 - 26

**Tab. 4.2.:** Expression von T-Zellmarkern bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion von 5 Patienten ohne Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

Von großer Bedeutung ist es, vorab zu erwähnen, dass in den fünf Proben bereits im Rahmen der histologischen Beurteilung diskrete perivaskuläre Infiltrate gefunden werden konnten. Diese setzten sich hauptsächlich aus Lymphozyten und wenigen Makrophagen zusammen.

Bei den in Tab. 4.2. genannten Ergebnissen handelt es sich natürlich um relative Daten. Der Anteil von CD3+ Zellen war in den Infiltraten durchschnittlich bei 68% gelegen. Es sind zwar absolut gesehen wenige Zellen vorhanden, allerdings tragen im Schnitt zwei Drittel dieser Zellen den Marker CD3 auf ihrer Oberfläche. Der Rest des Infiltrats setzt sich größtenteils aus Makrophagen zusammen. Eine Einwanderung von Zellen in die Epidermis konnte nicht beobachtet werden. Auch war keine Spongiose zu sehen.



**Abb. 4.3.:** Immunhistologische Darstellung der CD3+ T-Zellen innerhalb des diskreten dermalen Infiltrats bei einem Patienten ohne Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-CD3; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 100-fach

Bei den weiteren Untersuchungen bezüglich der Subtypenzugehörigkeit zeigte sich hier wiederum ein mit 48% deutliches Überwiegen der CD4+ Zellen über die CD8+ Zellen. Allerdings war hier der Unterschied nicht ganz so deutlich wie bei den Proben der Nickelallergiker. In der Probe A44 war das Verhältnis sogar nahezu ausgeglichen (30% CD4+ und 25% CD8+). Ausnahme bildet die Probe A39. Hier überwogen die CD4+ Zellen deutlich.

**Fazit:** In den Gewebeproben aus den Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzembildung liegt ein diskretes, perivaskuläres T-Zell-Infiltrat vor, bei dem tendenziell die CD4+ Zellen überwiegen.

#### 4.2.3. Expression von T-Zellmarkern bei Patienten mit Psoriasis vulgaris

In den Gewebeproben der Patienten mit Psoriasis vulgaris waren stets ausgeprägte Lymphozyten-Infiltrate zu sehen.

Patient	CD 3	CD4	CD8
<b>A30</b>	86%	51%	34%
<b>A31</b>	69%	32%	32%
<b>A32</b>	90%	70%	21%
<b>A33</b>	84%	43%	40%
<b>A34</b>	88%	51%	38%

<b>Mittelwert</b>	83%	49%	33%
<b>Min / Max</b>	69 - 90	32 - 70	21 - 40

**Tab. 4.3.:** Expression von T-Zellmarkern bei Gewebeproben aus Plaquearealen von 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

In der Immunhistologie zeigte sich dann, dass auch hier die CD3+ Zellen das inflammatorische Geschehen dominieren. Mit 83% war der relative Anteil der T-Zellen am Infiltrat sogar noch größer als beim Nickelkontaktexzem. Spongiotische Veränderungen oder Einwanderung von T-Zellen in die Epidermis waren nicht zu eruieren. Von einem deutlichen Überwiegen der CD4+ Zellen über die CD8+ Zellen

konnte bei der Analyse der T-Zellsubtypen allerdings nicht gesprochen werden. Der relative Anteil der CD8+ Zellen war hier wesentlich höher anzusetzen. In der Regel war das Verhältnis zwischen CD4+ und CD8+ Zellen relativ ausgeglichen mit einem leichten Übergewicht zugunsten von CD4. Ausnahme bildete mit einem deutlichen Unterschied (70% zu 21%) die Probe A32.

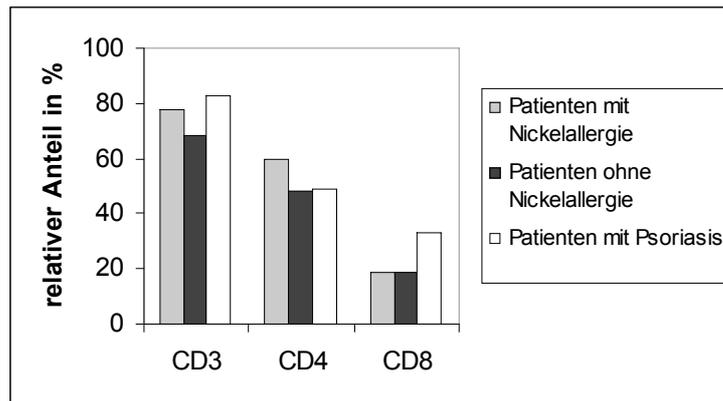
Vereinfachend vorausgesetzt, dass es sich bei den CD4+ und CD8+ Zellen ausschließlich um Subtypen der CD3+ Zellen handelt, dann wäre der Anteil der CD4+ Zellen innerhalb der T-Zell-Population 59% im Gegensatz zu 40% CD8+ Zellen.

**Fazit:** Bei den fünf Proben aus Plaqueearealen bei Patienten mit Psoriasis vulgaris fand sich ein ausgeprägtes T-Zellinfiltrat, wobei CD4+ Zellen die CD8+ Zellen gering überwogen.

#### 4.2.4. Zusammenfassung

Tabelle 4.4. und Abbildung 4.4. zeigen einen Überblick über die verschiedenen Ergebnisse bei den jeweiligen Kollektiven. In allen Gruppen lag ein CD3+ Infiltrat vor. Es konnte stets ein Überwiegen der CD4+ Zellen beschrieben werden.

Patientenkollektiv	CD 3	CD4	CD8
Nickelallergie	78%	60%	19%
negativer ECT	68%	48%	19%
Psoriasis	83%	49%	33%



**Tab. 4.4. und Abb. 4.4.:** Übersicht über die Ausprägung der T-Zellmarker bei den verschiedenen Patientenkollektiven: dargestellt werden die prozentualen, relativen Anteile der gefärbten Zellen (separat für jeden Marker) am Gesamtbestand der Infiltratzellen (100% entspricht: alle Zellen im Infiltrat)

### 4.3. Expression von CLA und CCR5

#### 4.3.1. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten mit Nickelallergie

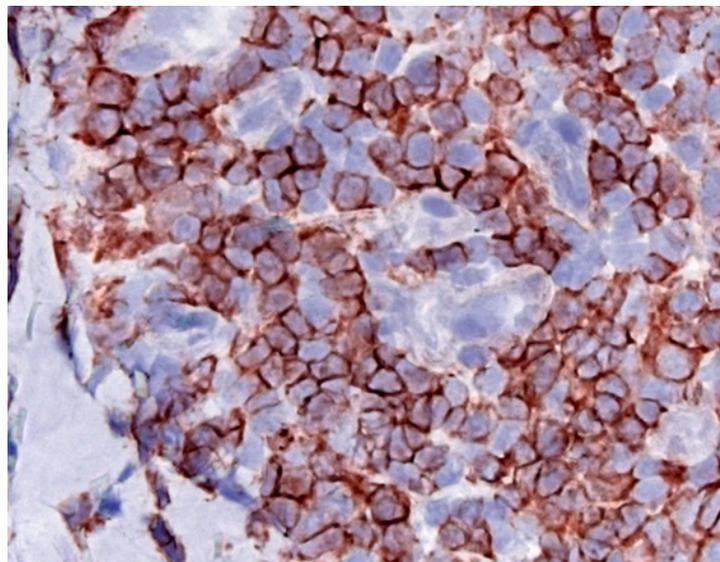
Weiterhin wurde die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 und des Skin-Homing Rezeptors CLA auf den Infiltratzellen untersucht (siehe Tabelle 4.5.).

Im Durchschnitt waren etwa die Hälfte (53%) der Zellen CCR5+, wobei die Ergebnisse sich zwischen 0 und 74% bewegten. Eine Ausnahme bildete die Probe X9, in welcher auch nach mehrfachen Wiederholungen kein CCR5 Nachweis gelang. Eine Ursache für dieses Phänomen konnte nicht eruiert werden. Würde man die Probe X9 aus dem Kollektiv nehmen, so würde der Durchschnittwert der CCR5+ Zellen 59% (Minimalwert 41%, Maximalwert 74%) betragen. Anhand des Vergleichs mit der anti-CD3 Färbung konnte hier schon gesagt werden, dass die CCR5 Expression hauptsächlich innerhalb der T-lymphozytär dominierten Infiltrate zu sehen war.

Patient	CCR5	CLA
X1	71%	74%
X2	73%	69%
X3	50%	30%
X5	43%	57%
X6	41%	60%
X7	60%	26%
X8	65%	56%
X9	0%	52%
X11	74%	49%
X15	57%	68%

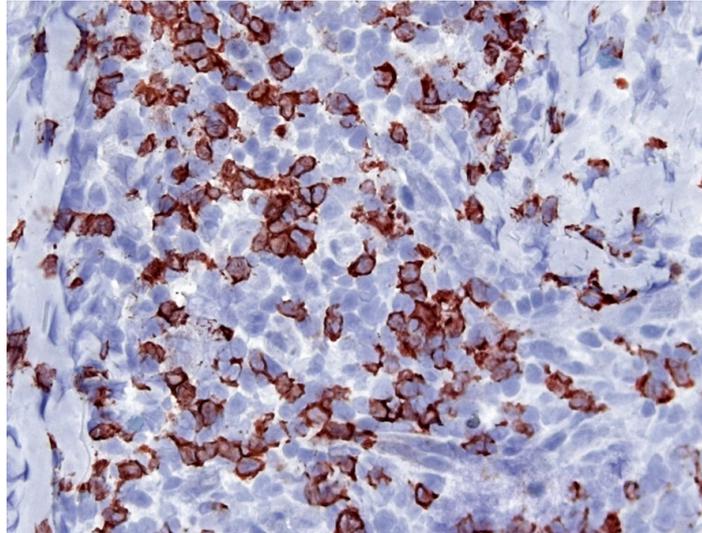
<b>Mittelwert</b>	53%	54%
<b>Min / Max</b>	0 - 74	26 - 74

**Tab. 4.5.:** Expression der Oberflächenmarker CCR5 und CLA bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.



**Abb. 4.5.:** Immunhistologische Darstellung der CCR5+ Zellen innerhalb des dermalen Infiltrats bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-CCR5; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 400-fach

Ähnlich verhielt es sich mit der Expression des CLA-Antigens. In der Tabelle 4.4. wird deutlich, dass die Ausprägung im Infiltrat vergleichbar mit der CCR5+ Expression war. Allerdings sind hier die Unterschiede zwischen den Einzelproben mit einem Minimalwert von 26% (X7) und einem Maximalwert von 74% (X1) stärker (sofern man bei den CCR5-Färbungen die Probe X9 ausschließt). Das CLA-Antigen kann definitionsgemäß ausschließlich auf Lymphozyten gefunden werden.



**Abb. 4.6.:** Immunhistologische Darstellung der CLA+ Zellen innerhalb des dermalen Infiltrats bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-CLA; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach

**Fazit:** Bei den Patienten mit Nickelkontaktallergie konnten die Oberflächenmarker CCR5 und CLA in etwa gleichem Ausmaß (ca. die Hälfte der Infiltratzellen) innerhalb des Infiltrats nachgewiesen werden. Die Marker waren hauptsächlich bzw. ausschließlich auf Lymphozyten exprimiert.

#### 4.3.2. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten ohne Nickelallergie

Bei den immunhistologischen Färbungen bezüglich der CCR5 und CLA Expression ergaben sich bei den Patienten ohne Nickelallergie folgende Ergebnisse (Tabelle 4.6.):

Patient	CCR5	CLA
A39	0%	0%
A40	0%	0%
A43	1%	0%
A44	0%	0%
A60	0%	0%

Mittelwert	0%	0%
Min / Max	0 - 1	0

**Tab. 4.6.:** Expression der Oberflächenmarker CCR5 und CLA bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion von 5 Patienten ohne Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

Der Marker CLA konnte in keinem der immunhistologisch aufgearbeiteten Gewebe gefunden werden. Ähnlich verhielt es sich mit dem Oberflächenmarker CCR5. Lediglich in der Probe A43 konnte CCR5 auf einer Zelle nachgewiesen werden (durch eine Wiederholungsfärbung bestätigt).

**Fazit:** In den fünf Kontrollgeweben (Biopsien von Patienten ohne Nickelallergie) war CLA gar nicht und CCR5 nur in einer Probe nachweisbar.

#### 4.3.3. Expression von CLA und CCR5 bei Patienten mit Psoriasis vulgaris

Schließlich wurde auch die CCR5 und CLA Expression bei den Psoriasisproben untersucht (Tabelle 4.7.):

Patient	CCR5	CLA
A30	42%	13%
A31	63%	41%
A32	55%	8%
A33	71%	40%
A34	40%	20%

<b>Mittelwert</b>	54%	24%
<b>Min / Max</b>	40 - 71	8 - 41

**Tab. 4.7.:** Expression der Oberflächenmarker CCR5 und CLA bei Gewebeproben aus Plaquearealen von 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

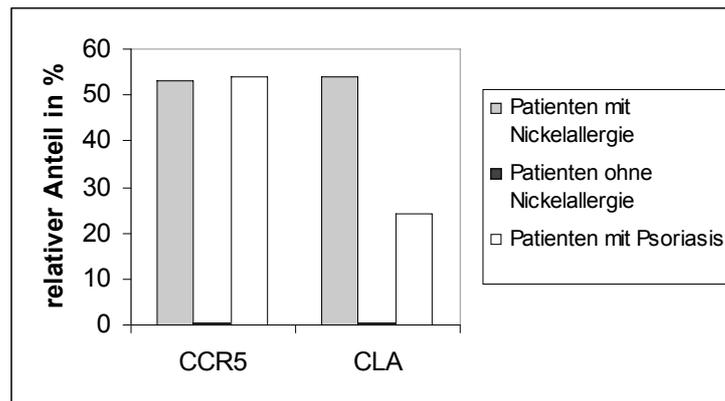
Mit einem relativen Anteil von 54% an der Gesamtzahl der Infiltratzellen ist die Expression von CCR5 bei den Patienten mit Psoriasis vergleichbar mit den Ergebnissen beim Kollektiv der Nickelallergiker. Deutlich niedriger ist mit durchschnittlich nur 24% das Antigen CLA exprimiert. Auch hier war wie bei den Nickelallergikern zu sehen, dass CCR5 zu einem Großteil und CLA ausschließlich auf Lymphozyten zu finden war.

**Fazit:** CCR5 ist auf den Lymphozyten der Gewebeschnitte bei den Patienten mit Psoriasis ähnlich häufig exprimiert wie bei den Nickelallergikern, die CLA Expression ist deutlich seltener.

#### 4.3.4. Zusammenfassung

Im Folgenden werden alle Ergebnisse zu den CCR5 und CLA Färbungen in einer Übersichtstabelle (Tabelle 4.8.) und einer Grafik (Abb. 4.7.) dargestellt:

Patientenkollektiv	CCR5	CLA
Nickelallergie	53%	54%
negativer ECT	0%	0%
Psoriasis	54%	24%



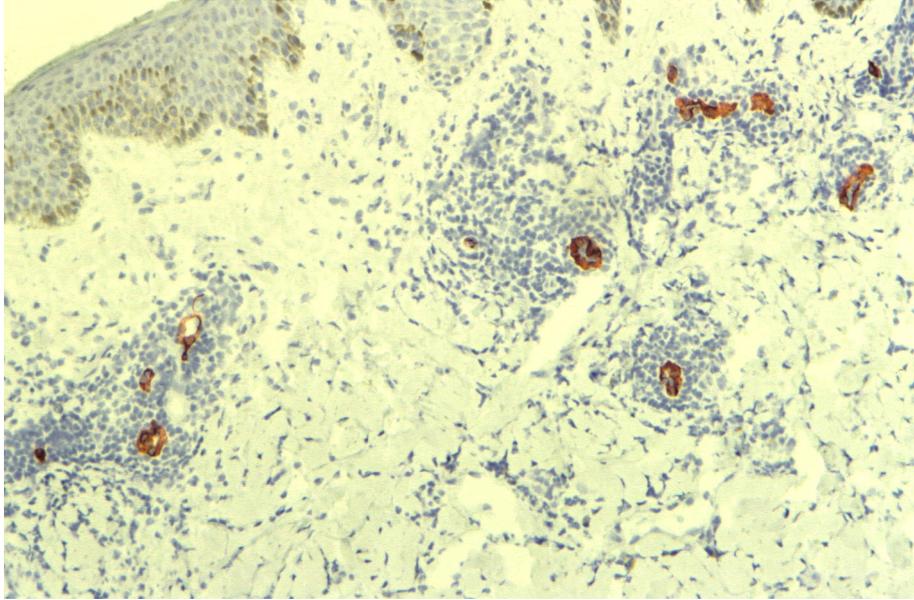
**Tab. 4.8. und Abb. 4.7.:** Übersicht über die Ausprägung der CCR5 und CLA Expression auf den Infiltratzellen bei den verschiedenen Patientenkollektiven

#### 4.4. Expression von Adhäsionsstrukturen

##### 4.4.1. Adhäsionsstrukturen bei Patienten mit Nickelallergie

Bei der Untersuchung der Ausprägung von Adhäsionsstrukturen wurde die Expression von E-Selektin und ICAM-1 immunhistologisch untersucht.

Im Falle dieser Färbeserie war es sinnvoller, eine rein deskriptive Ergebnisdarstellung vorzunehmen. Beschrieben wurde die Präsenz von E-Selektin und ICAM-1 auf dem Endothel der in den Gewebeschnitten vorhandenen kleinen Gefäße. Bei den Proben X1, X5, X6, X7, X9, X11 und X15 konnte der Marker E-Selektin (CD62E) auf allen im Schnitt vorhandenen kleinen Gefäßen in einer kräftigen Färbung nachgewiesen werden. In den Geweben X2, X3 und X8 konnten neben zahlreichen Endothelien, welche E-Selektin exprimierten auch einzelne Gefäße dargestellt werden, die nicht angefärbt wurden.



**Abb. 4.8.:** Immunhistologische Darstellung der E-Selektin-Expression bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-CD62E; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 100-fach

Vergleichbar waren die Ergebnisse bei der ICAM-1 Färbung: Auch hier gab es Proben (X2, X6, X8, X15), in denen die Endothelschicht aller Gefäße angefärbt war. In den anderen sechs Proben fanden sich jeweils vereinzelt kleine Gefäße, welche keine ICAM-1 Expression zeigten. Auffallend war bei der Untersuchung dieses Adhäsionsmoleküls, dass auch ein Großteil der Epidermiszellen (durchschnittlich 82%; Minimalwert 70%, Maximalwert 93%) angefärbt war. Es findet also auch eine deutliche ICAM-1 Expression der Epidermis statt.

#### 4.4.2. Adhäsionsstrukturen bei Patienten ohne Nickelallergie

Das Molekül E-Selektin konnte in den fünf Gewebeproben aus den Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion nicht nachgewiesen werden. ICAM-1 war dagegen sporadisch auf einzelnen Gefäßen in schwacher Färbung sichtbar. Im Bereich der Epidermis waren einzelne Zellen angefärbt, so dass sich bei der Auszählung ein Durchschnittswert von 10% ergab (Minimalwert 1%, Maximalwert 15%).

#### **4.4.3. Adhäsionsstrukturen bei Patienten mit Psoriasis**

Diskret war die Expression von E-Selektin in den Gewebeproben der Patienten mit Psoriasis. Es waren nur wenige Gefäßwände angefärbt. Auch stellte sich hier keine kräftige Färbung der gesamten Endothelauskleidung wie bei den ECT+ Proben dar, sondern es waren nur einzelnen Spots angefärbt.

ICAM-1 war hingegen wesentlich stärker auf der Gefäßoberfläche nachweisbar. In drei von fünf Proben waren alle vorhandenen Gefäße angefärbt. Auch die Expression von ICAM-1 innerhalb der Epidermis zeigte eine starke Ausprägung (Durchschnitt: 85%; Minimalwert 80%, Maximalwert 93%). Damit waren die Werte vergleichbar mit den Gewebeproben der Nickelallergiker.

#### **4.5. Ausprägung der proliferativen Aktivität**

##### **4.5.1. Proliferation bei Patienten mit Nickelallergie**

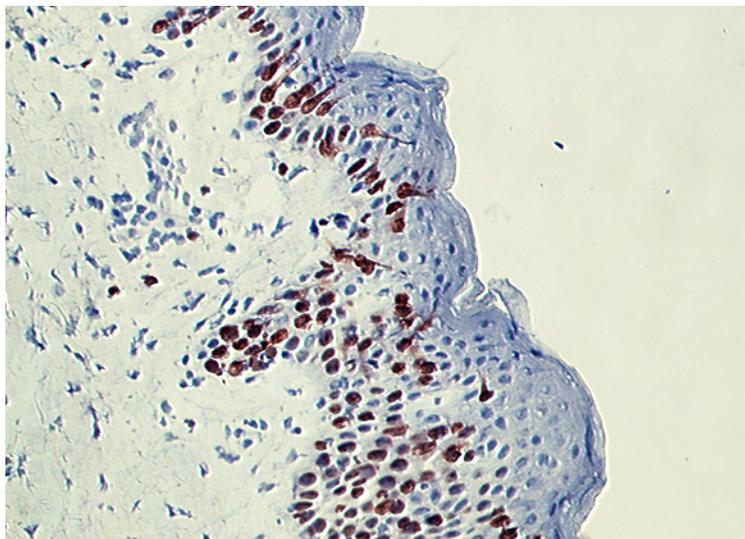
Tabelle 4.9. zeigt die Ergebnisse der Gewebefärbungen zum Nachweis von Ki-67 bei den 10 Patienten mit Nickel-induziertem Kontaktekzem.

Der Proliferationsmarker konnte sowohl in der Epidermis als auch im Infiltrat nachgewiesen werden. Die Proliferationsrate war in beiden Gewebekompartimenten mit 39% bzw. 33% in etwa gleich. Es fällt auf, dass in den Proben X6, X9 und vor allem X2 die Unterschiede zwischen den Proliferationsraten in den Zellkompartimenten Epidermis und Infiltrat relativ groß sind. Ki-67 positive Zellen fanden sich epidermal sowohl im Stratum basale, wobei hier häufig ein Großteil der Zellen angefärbt war, als auch in unterschiedlich starker Ausprägung im Stratum spinosum. Die Verteilung der proliferierenden Zellen im Infiltrat folgte keinem erkennbaren Muster. Bemerkenswert ist die Probe X9: hier wurde innerhalb der Epidermis ungewöhnlich hohe Proliferation dargestellt.

Patient	Ki-67 Epidermis	Ki-67 Infiltrat
X1	43%	47%
X2	60%	23%
X3	24%	22%
X5	43%	39%
X6	18%	42%
X7	30%	31%
X8	22%	25%
X9	69%	43%
X11	52%	38%
X15	24%	17%

<b>Mittelwert</b>	39%	33%
<b>Min / Max</b>	18 - 69	17 - 47

**Tab. 4.9.:** Darstellung der proliferativen Aktivität bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.



**Abb. 4.9.:** Immunhistologische Darstellung der proliferierenden Zellen innerhalb der Epidermis bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-Ki-67; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 100-fach

**Fazit:** Es zeigten sich gering bis mittelgradige Proliferationsraten in Epidermis und Infiltrat der Gewebeproben von Nickelallergikern.

#### 4.5.2. Proliferation bei Patienten ohne Nickelallergie

In den Kontrollgeweben der Patienten ohne Nickelallergie zeigten sich deutliche Unterschiede:

Patient	Ki-67 Epidermis	Ki-67 Infiltrat
<b>A39</b>	9%	7%
<b>A40</b>	13%	11%
<b>A43</b>	5%	0%
<b>A44</b>	14%	3%
<b>A60</b>	10%	5%
<b>Mittelwert</b>	10%	5%
<b>Min / Max</b>	5 - 14	0 - 11

**Tab. 4.10.:** Darstellung der proliferativen Aktivität bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion von 5 Patienten ohne Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

Wie aus Tabelle 4.10. ersichtlich wird, konnte proliferative Aktivität epidermal in allen Kontrollgeweben gesehen werden. Die Anteil der Ki-67+ Zellen war allerdings in allen Präparaten mit durchschnittlich nur 10% äußerst gering. In der dermalen Zellansammlung war Ki-67 verglichen mit der Epidermis noch seltener nachweisbar (durchschnittlich nur bei 5% der Zellen), in der Probe A 43 sogar überhaupt nicht.

**Fazit:** Die Gewebeproben der nicht-allergischen Kontrollgruppe zeigten minimale Proliferation in Epidermis und Infiltrat.

#### 4.5.3. Proliferation bei Patienten mit Psoriasis vulgaris

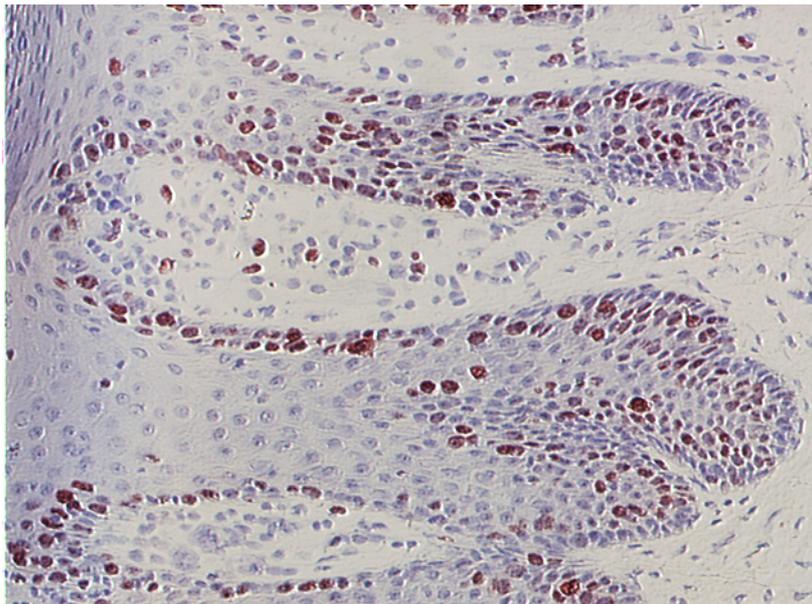
Schließlich wurde die Ki-67 Expression auch in den Proben der Psoriasispatienten untersucht.

Patient	Ki-67 Epidermis	Ki-67 Infiltrat
A30	66%	44%
A31	62%	32%
A32	67%	40%
A33	41%	17%
A34	60%	41%

<b>Mittelwert</b>	59%	35%
<b>Min / Max</b>	41 - 67	17 - 44

**Tab. 4.11.:** Darstellung der proliferativen Aktivität bei Gewebeproben aus Plaquarealen von 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.

Auffallend ist bei diesen Proben die ausgeprägte Proliferation innerhalb der Epidermis. Mit durchschnittlich 59% ist diese wesentlich höher als bei den Nickelallergikern. Das Ergebnis der gesteigerten Proliferation ist eine Akanthose. Der Anteil der Ki-67+ Zellen im Infiltrat ist vergleichbar mit dem Prozentsatz bei den Gewebeproben aus den Ekzemarealen.



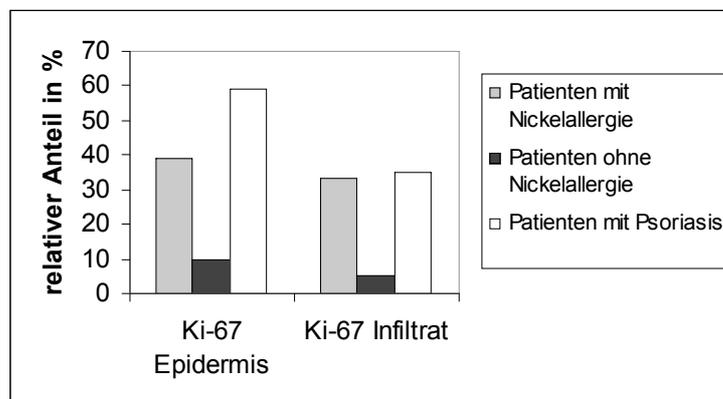
**Abb. 4.10.:** Immunhistologische Darstellung der proliferierenden Zellen innerhalb der Epidermis bei einem Patienten mit Psoriasis vulgaris. ABC-Färbung; Ak: anti-Ki-67; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 200-fach

**Fazit:** Bei der Psoriasis zeigte sich eine deutlich gesteigerte Proliferation in der Epidermis und mittelgradige Proliferationsraten im Infiltrat.

#### 4.5.4. Zusammenfassung

Auch hier sollen die Mittelwerte der Proliferationsraten bei den einzelnen Kollektiven in einer Übersichtsgrafik dargestellt werden.

Patientenkollektiv	Ki-67 Epidermis	Ki-67 Infiltrat
Nickelallergie	39%	33%
negativer ECT	10%	5%
Psoriasis	59%	35%



**Tab. 4.12. und Abb. 4.11.:** Übersicht über die Ausprägung der Proliferation bei den verschiedenen Patientenkollektiven

## 4.6. Nachweis von Apoptose

### 4.6.1. Apoptose bei Patienten mit Nickelallergie

Die Ergebnisse der Apoptosefärbungen an den Kontaktekzemhautproben sind in den Tabellen 4.13. und 4.14. aufgelistet.

Patient	Fas R Epidermis	Fas R Infiltrat	Fas L Epidermis	Fas L Infiltrat
X1	88%	71%	8%	3%
X2	65%	75%	3%	20%
X3	90%	30%	7%	15%
X5	82%	72%	0%	0%
X6	58%	55%	0%	0%
X7	62%	61%	11%	22%
X8	53%	50%	0%	0%
X9	58%	37%	5%	12%
X11	64%	46%	9%	8%
X15	70%	35%	7%	17%

<b>Mittelwert</b>	69%	53%	5%	10%
<b>Min / Max</b>	53 - 90	30 - 75	0 - 11	0 - 22

**Tab. 4.13.:** Ausprägung der FasR und FasL Expression bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.; FasR: Fas Rezeptor; FasL: Fas Ligand

Der Fas Rezeptor CD95 konnte in den epidermalen Zellen teilweise mäßig, teilweise aber auch häufig nachgewiesen werden (s. Abb. 4.10.). In manchen Präparaten, beispielsweise bei der Probe X1 und X3, waren in bestimmten Bereichen des Schnitts ganze Verbände von benachbarten Keratinozyten CD95+. Im Durchschnitt waren 69% der Zellen positiv angefärbt. Im dermalen Zellinfiltrat waren die Ergebnisse ähnlich breit gestreut: Im Mittel war zwar auch hier eine mäßig ausgebildete Expression nachweisbar (53%), allerdings wurde neben starker (X1 und X5) hier auch geringe Ausprägung bei X3, X9 und X15 festgestellt.

Gegensätzlich waren dazu dann die Ergebnisse zu Fas Ligand (FasL). Epidermal war FasL in drei von zehn Proben (X5, X6 und X8) überhaupt nicht nachzuweisen, in den restlichen sieben Geweben war die Expression relativ diskret ausgeprägt. Vergleichbar selten stellte sich das Molekül in den Untersuchungen des entzündlichen Infiltrats dar: In denselben Proben, in denen epidermal nichts nachgewiesen werden konnte, fehlte FasL auch dermal. Durch eine wiederholte

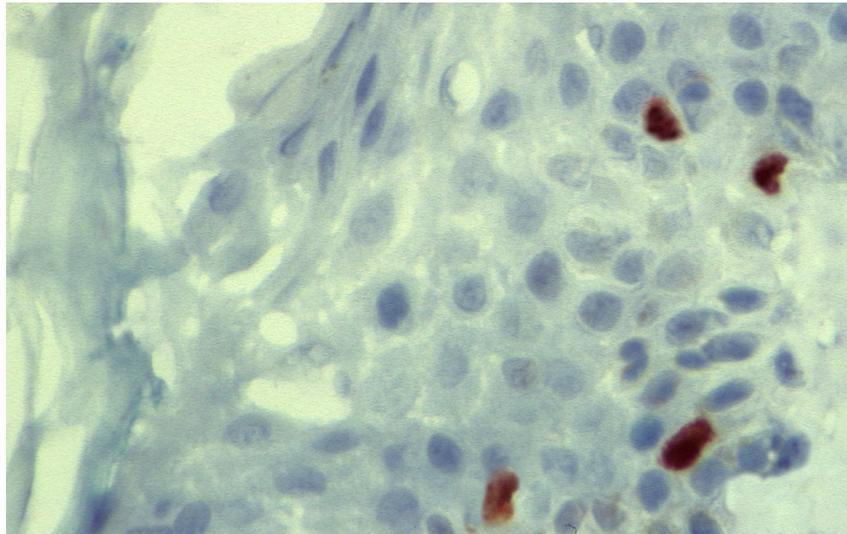
Färbeserie unter Mitverarbeitung einer Positivkontrolle wurde ein Fehler in der Färbeprozedur ausgeschlossen.

Patient	Apoptose Epidermis	Apoptose Infiltrat
X1	2%	2%
X2	4%	2%
X3	1%	2%
X5	1%	4%
X6	1%	2%
X7	2%	0%
X8	2%	2%
X9	3%	3%
X11	3%	3%
X15	5%	3%
<b>Mittelwert</b>	2%	2%
<b>Min / Max</b>	1 - 5	0 - 4

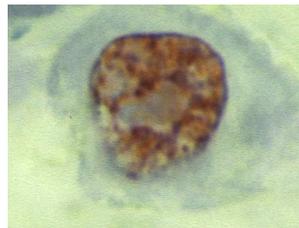
**Tab. 4.14.:** Auswertung der Apoptosefärbungen bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.;

In der Epidermis der 10 Gewebeproben ergaben sich Apoptoseraten zwischen 1 und 5%, wobei der Durchschnitt 2% (2,4%) betrug. Auffällig war hierbei, dass sich apoptotische Zellen auch innerhalb des Stratum germinativum fanden. Dieser Tatbestand konnte nur beim Kollektiv der Nickelallergiker festgestellt werden.

Die Apoptose innerhalb des zellulären Infiltrats erreichte Werte zwischen 0 und 4% mit einem Durchschnittswert von 2% (2,3%). Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Proben sind in dieser Färbeserie sehr gering.



**Abb. 4.12.:** Immunhistologische Darstellung der apoptotischen Zellen innerhalb der Epidermis bei einem Patienten mit Nickelallergie. Angefärbte Zellen im Stratum germinativum. ABC-Färbung; Ak: anti-ssDNA; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 400-fach



**Abb. 4.13.:** Immunhistologische Darstellung einer apoptotischen Zellen mit typischen Kernveränderungen innerhalb des dermalen Infiltrats bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung; Ak: anti-ssDNA; Chromogen: AEC; Vergrößerung: 1000-fach

**Fazit:** Die Gewebeproben der Patienten mit Nickelkontaktallergie zeigten in der Epidermis und im Infiltrat zum Teil hohe Expression von FasR. Im Gegensatz dazu war die FasL Expression nur sehr gering ausgeprägt. Die Apoptoseraten in Epidermis und Infiltrat betragen im Mittel 2%. Es waren auch apoptotische Zellen im Stratum germinativum zu finden.

#### 4.6.2. Apoptose bei Patienten ohne Nickelallergie

Des weiteren wurden die Apoptosefärbungen bei dem Kontrollkollektiv ausgewertet:

Patient	Fas R Epidermis	Fas R Infiltrat	Fas L Epidermis	Fas L Infiltrat
<b>A39</b>	8%	0%	0%	0%
<b>A40</b>	0%	1%	0%	0%
<b>A43</b>	0%	0%	0%	0%
<b>A44</b>	6%	3%	0%	0%
<b>A60</b>	0%	1%	0%	0%

<b>Mittelwert</b>	3%	1%	0%	0%
<b>Min / Max</b>	0 - 8	0 - 3	0	0

**Tab. 4.15.:** Ausprägung der FasR und FasL Expression bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion von 5 Patienten ohne Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1. und 4.13.

Patient	Apoptose Epidermis	Apoptose Infiltrat
<b>A39</b>	1%	0%
<b>A40</b>	0%	0%
<b>A43</b>	0%	2%
<b>A44</b>	1%	0%
<b>A60</b>	0%	0%

<b>Mittelwert</b>	0%	0%
<b>Min / Max</b>	0 - 1	0 - 2

**Tab. 4.16.:** Auswertung der Apoptosefärbungen bei Gewebeproben aus Nickel-ECT-Arealen ohne Ekzemreaktion von 5 Patienten ohne Nickelkontaktallergie; Abkürzungen: s. Tab. 4.1.;

Der FasR CD95, welcher sich in den ECT+ Arealen sehr deutlich darstellen ließ, war hier kaum nachweisbar. In der Epidermis war er in zwei Proben (A 39, A 44) auf vereinzelt Zellen vorhanden (8 bzw. 6%), gleiches galt für die Zellen im Stratum papillare: Hier waren in drei Proben (A 40, A 44, A 60) Einzelzellen positiv angefärbt.

Gänzlich negativ fielen die Ergebnisse bezüglich der FasL Expression aus. Sowohl in der Epidermis als auch in der darunter liegenden Dermis konnte bei allen fünf Probanden keine Zelle gefunden werden, die FasL exprimiert hätte.

Letztendlich war auch die Rate der apoptotischen Zellen sehr gering: Mit Ausnahme der Probe A 60, in der überhaupt keine Apoptose gesehen werden konnte, waren in den anderen Präparaten stets einzelne Zellen positiv angefärbt und je nach den ausgewählten Gesichtsfeldern ergaben sich Werte zwischen 0,3 und 0,6% positiv angefarbter Zellen, die sich dann entweder zu 0% abrundeten oder zu 1% aufrundeten. Die endgültigen Ergebnisse sind hierbei ohne Angabe einer Dezimalstelle aufgeführt, da laut Beratungsgespräch mit Herrn Dr. Strobl vom IBE (s. Kapitel 3.8.) eine derart genaue Darstellung der Ergebnisse nicht im Verhältnis stehe zur Präzision der Auswertmethodik. Dennoch sollte erwähnt werden, dass die Ergebnisse alle in einem engen Intervall lagen. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass sich die apoptotischen Zellen ausschließlich oberhalb des Stratum germinativum befanden. In den Gewebeproben der 10 Personen mit positivem ECT-Ergebnis im Nickelareal zeigten sich dagegen auch apoptotische Zellen im Stratum spinosum.

Anders fiel das Ergebnis beim Nachweis der Apoptose in den dermalen Zellen aus. Hier war das Ergebnis in vier von fünf Fällen komplett negativ. Nur im Gewebe A 43 war eine Zelle positiv angefärbt, wodurch sich bei der geringen Zellzahl der Wert 2% errechnete.

**Fazit:** FasR konnte vereinzelt bei den Nicht-Allergikern nachgewiesen werden, FasL war in keiner der fünf Proben zu finden. Die apoptotische Aktivität in der Epidermis lag zwischen 0,3 und 0,6%, in der perivaskulären Zellansammlung war in der Regel keine Apoptose nachweisbar.

#### **4.6.3. Apoptose bei Patienten mit Psoriasis vulgaris**

Schließlich wurden noch die Apoptosefärbungen bei den Patienten mit Psoriasis vulgaris ausgewertet.

Patient	Fas R Epidermis	Fas R Infiltrat	Fas L Epidermis	Fas L Infiltrat
<b>A30</b>	11%	28%	0%	6%
<b>A31</b>	22%	41%	0%	8%
<b>A32</b>	15%	14%	5%	13%
<b>A33</b>	0%	11%	9%	0%
<b>A34</b>	8%	13%	0%	17%

<b>Mittelwert</b>	11%	21%	3%	9%
<b>Min / Max</b>	0 - 22	11 - 41	0 - 9	0 - 17

**Tab. 4.17.:** Ausprägung der FasR und FasL Expression bei Gewebeproben aus Plaquarealen von 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris; Abkürzungen: s. Tab. 4.1. und 4.13.

Patient	Apoptose Epidermis	Apoptose Infiltrat
<b>A30</b>	1%	1%
<b>A31</b>	0%	1%
<b>A32</b>	1%	0%
<b>A33</b>	1%	1%
<b>A34</b>	0%	1%

<b>Mittelwert</b>	1%	1%
<b>Min / Max</b>	0-1	0-1

**Tab. 4.16.:** Auswertung der Apoptosefärbungen bei Gewebeproben aus Plaquarealen von 5 Patienten mit Psoriasis vulgaris; Abkürzungen: s. Tab. 4.1

Der FasR war generell gesehen nur sehr vereinzelt zu finden, im Infiltrat allerdings häufiger als in der Epidermis. Mit 11% bzw. 21% waren die Anteile der positiven Zellen deutlich niedriger als bei den Nickelallergikern.

Vergleichbar mit den 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie waren die Ergebnisse zur FasL Expression, die wie bereits erwähnt auch beim Nickel-induzierten Ekzem nur sehr gering ausgefallen ist. Auch hier zeigten sich in manchen Gewebeschnitten

vereinzelt positive Zellen, wobei auch Proben ohne FasL Expression zu verzeichnen waren.

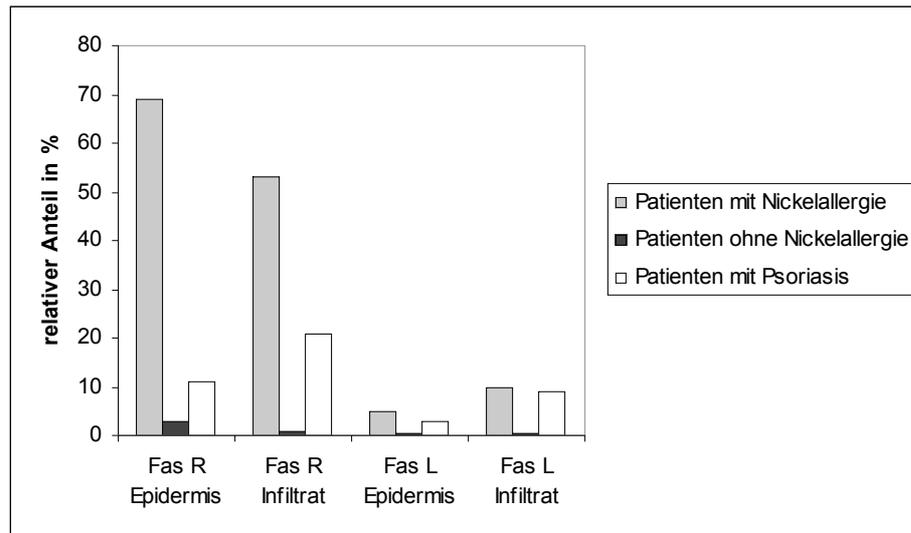
Die Apoptoserate war verglichen mit den Schnitten aus den nickelpositiven ECT-Geweben mit durchschnittlich 1% niedriger anzusetzen. Sowohl epidermal als auch im Infiltrat waren nur vereinzelt apoptotische Zellen nachweisbar und auch hier handelte es sich ähnlich wie bei den ECT-negativen Kontrollen um Werte zwischen 0,3% bis 0,8%, wobei die Zahlen hier geringgradig höher waren: Im Infiltrat war die Apoptoserate leicht gesteigert gegenüber der klinisch reaktionslosen Haut. Epidermal war dies ähnlich.

**Fazit:** FasR war in geringer Ausprägung in den Gewebeschnitten der Psoriasispatienten nachweisbar; FasL ähnlich wie bei den Nickelallergikern nur vereinzelt. Die Apoptoseraten lagen im Schnitt über denen der ECT-negativen Kontrollgruppe und waren niedriger als bei den ECT-positiven Proben.

#### 4.6.4. Zusammenfassung

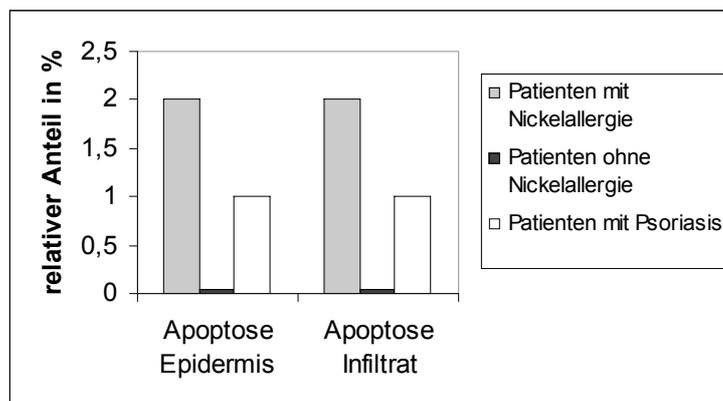
In folgenden Tabellen und Grafiken sind die Ergebnisse der Apoptosefärbungen von allen drei Patientenkollektiven zusammengefasst.

Patientenkollektiv	Fas R Epidermis	Fas R Infiltrat	Fas L Epidermis	Fas L Infiltrat
Nickelallergie	69%	53%	5%	10%
negativer ECT	3%	1%	0%	0%
Psoriasis	11%	21%	3%	9%



**Tab. 4.17. und Abb. 4.14.:** Übersicht über die Expression von FasR und FasL bei den verschiedenen Patientenkollektiven

Patientenkollektiv	Apoptose Epidermis	Apoptose Infiltrat
Nickelallergie	2%	2%
negativer ECT	0%	0%
Psoriasis	1%	1%



**Tab. 4.18. und Abb. 4.15.:** Übersicht über die Ausprägung der Apoptose bei den verschiedenen Patientenkollektiven

#### 4.7. Untersuchung zur Kolokalisation von CD4 und CCR5

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Doppelfärbungen zur Untersuchung der Kolokalisation von CD4 und CCR5 tabellarisch aufgelistet:

X1	CCR5+	CCR5-	
CD4+	45%	15%	60%
CD4-	24%	16%	40%
	69%	31%	

X2	CCR5+	CCR5-	
CD4+	67%	8%	75%
CD4-	5%	20%	25%
	72%	28%	

X3	CCR5+	CCR5-	
CD4+	27%	24%	51%
CD4-	21%	28%	49%
	48%	52%	

X5	CCR5+	CCR5-	
CD4+	46%	23%	69%
CD4-	0%	31%	31%
	46%	54%	

X6	CCR5+	CCR5-	
CD4+	39%	14%	53%
CD4-	3%	44%	47%
	42%	58%	

X7	CCR5+	CCR5-	
CD4+	32%	3%	35%
CD4-	26%	39%	65%
	58%	42%	

X8	CCR5+	CCR5-	
CD4+	41%	25%	66%
CD4-	24%	10%	34%
	65%	35%	

X9	CCR5+	CCR5-	
CD4+	0%	51%	51%
CD4-	0%	49%	49%
	0%	100%	

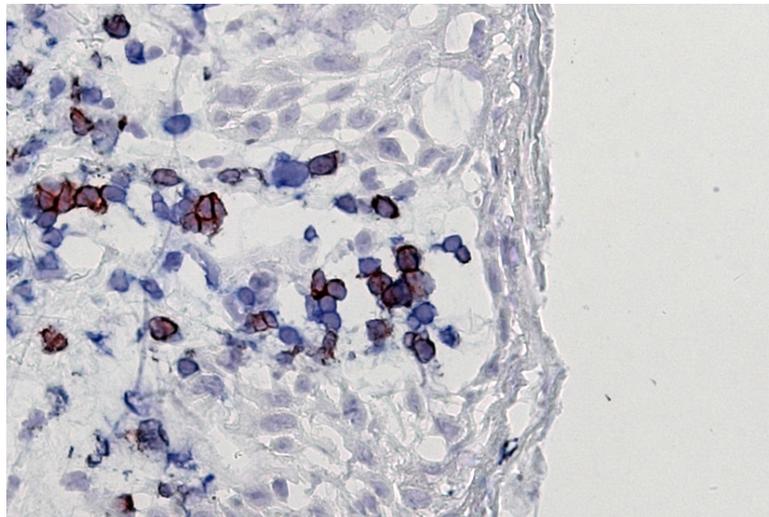
X11	CCR5+	CCR5-	
CD4+	70%	12%	82%
CD4-	6%	12%	18%
	76%	24%	

X15	CCR5+	CCR5-	
CD4+	42%	21%	63%
CD4-	13%	24%	37%
	55%	45%	

**Tab. 4.19.:** Vier-Felder-Tafeln zu den Doppelfärbungen CD4 / CCR5 bei Nickel-ECT-Arealen mit Ekzemreaktion von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie

Bereits im direkten Vergleich der Einfachfärbungen zur Expression von CD3 und CCR5 zeigte sich, dass der Oberflächenmarker CCR5 hauptsächlich auf Lymphozyten exprimiert ist. Mittels des Nachweises einer Koexpression von CCR5

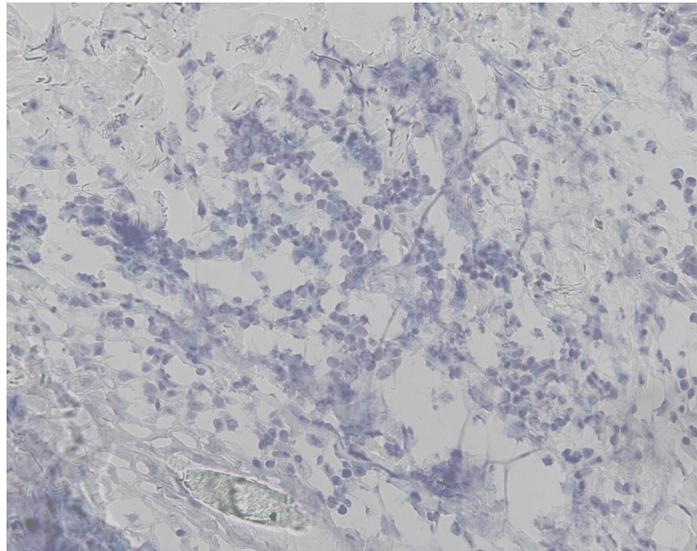
und CD4 soll in dieser Arbeit eine Stellungnahme zum Vorliegen einer Th1 Antwort abgegeben werden. In den darauf hin durchgeführten Doppelfärbungen zeigte sich, dass in Mittel 41% der Infiltratzellen CD4+ CCR5+ waren (Minimalwert: 0% bei X9, Maximalwert 70% bei X11). Untersucht man separat die Population der CD4+ Zellen, so sind von diesen im Durchschnitt 66% auch CCR5+ (Minimalwert 0% bei X9 und 91% bei X7). Würde man die Probe X9 aus dem Kollektiv entfernen, wäre der Anteil der CCR5+ innerhalb der CD4+ Zellen sogar 74%. In jedem Fall wird deutlich, dass ein Großteil der CD4+ Zellen den Marker CCR5 trägt. Allerdings gibt es auch in fast jeder Probe (außer bei X5 und X9) Zellen, welche CCR5+ sind, allerdings nicht zur Gruppe der CD4+ Zellen gezählt werden können. Hierbei handelt es sich vermutlich um CD8+ T-Lymphozyten oder zu einem geringen Teil um andere Zellen, z. B. Monozyten.



**Abb. 4.15.:** Immunhistologische Darstellung der Kolokalisation von CD4 und CCR5 bei einem Patienten mit Nickelallergie. Es zeigt sich eine Vesicula mit Einwanderung von Lymphozyten. ABC-Färbung: Ak: anti-CCR5; Chromogen: AEC; APAAP-Färbung: Ak: anti-CD4; Chromogen: Fast Blue; Vergrößerung: 400-fach

**Fazit:** In den Probiopsien aus den ECT Arealen bei den Patienten mit Nickelallergie dominiert ein CD4+ Infiltrat. Von diesen Zellen tragen im Mittel 66% zusätzlich den Oberflächenmarker CCR5. Insgesamt sind innerhalb des Infiltrats 41% der Zellen CCR5+ CD4+.

In folgender Abbildung wird noch die in Kapitel 3.6. beschriebene Kontrollfärbung dargestellt.



**Abb. 4.16.:** Immunhistologische Darstellung der Kontrollfärbung zu den Doppelfärbungen bei einem Patienten mit Nickelallergie. ABC-Färbung: Ak: anti-CCR5; Chromogen: keines; APAAP-Färbung ab Brückenantikörper; Chromogen: Neufuchsin; Es zeigt sich keine rote Färbung. Vergrößerung: 100-fach

In den bereits beschriebenen Kontrollfärbungen zeigten sich in 8 von 10 unterschiedlichen Gewebeproben erfreulicherweise keine Kreuzreaktionen. In zwei Proben zeigte sich ein sehr diskreter, rötlicher, unspezifischer Hintergrund. Dieser konnte von der spezifischen CD4 Färbung abgegrenzt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Charakteristika des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems

Das Nickel-induzierte allergische Kontaktekzem ist gekennzeichnet durch typische histologische Kriterien wie Spongiose, lymphohistiozytäre Infiltrate teils perivaskulär, teils epidermisnah und zum Teil auch durch das Auftreten von eosinophilen Granulozyten (*Nasemann, 1982; White, 1990*). Die entzündliche Reaktion ist T-Zell-dominiert. Zum einen sind die Lymphozyten bereits histologisch erkennbar. Zum anderen liegen auch in-vitro Stimulationsdaten vor, welche die entscheidende Rolle der T-Lymphozyten untermauern. Beispiele sind Ergebnisse aus Lymphozytentransformationstests (LTTs) bzw. Untersuchungen an Zellkulturen von aus Hautbiopsien isolierten Nickel-spezifischen T-Zellklonen. Hier wurde häufig ein Th1 Zytokinsekretionsmuster gefunden (*Werfel, 1997; Thomas, 2001*). Teilweise wurde auch eine Dichotomie der T-Zellen beschrieben, wobei aus der Haut isolierte T-Lymphozyten großteils IL-4, teilweise auch IFN $\gamma$ -Produktion aufwiesen (*Werfel, 1997*). Der Zytokinproduktion wird unter anderem auch ein Einfluss auf Keratinozytenwachstum und Apoptose zugesprochen (*Abbas, 2000; Fierlbeck, 1990; Gottlieb, 1990; Trautmann, 2000*). Weitere Studien zur Bestätigung der wichtigen Bedeutung der T-Zellen zeigen an T-Zell-defizienten Mäusen, dass diese kein Kontaktekzem entwickeln können (*Abbas, 2000*). Andererseits ist ein Nickel-induziertes Ekzem reproduzierbar sowohl im Mausmodell als auch am Menschen in Form des Epikutantests.

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der genaueren Charakterisierung des Zellinfiltrats. Zur Frage der funktionellen Einordnung von T-Zellen wird die Expression von Oberflächenmarkern analysiert. Weiter werden im Folgenden Adhäsionsstrukturen als Leitlinie für die Zelleinwanderung diskutiert und Apoptosevorgänge im Vergleich mit der gängigen Literatur besprochen. Schließlich dient zur Abgrenzung unspezifischer Nickel-induzierter Veränderungen beim Epikutantest die vergleichende Analyse von Nickel-exponierter, klinisch aber nicht reagierender Haut bei Personen ohne Nickelallergie.

## 5.2. Diskussion der Methodik

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Gefrierschnitten gearbeitet. Im Gegensatz zu paraffineingebettetem Gewebe sind in Kryostatschnitten morphologische Details schlechter erhalten. Dennoch wird diese Methode in der Immunhistologie häufig angewandt, da viele Oberflächenantigene durch die Fixation beim Paraffinschnitt zerstört werden, wo hingegen sie im Gefrierschnitt erhalten bleiben und dadurch besser nachweisbar sind. Aggressive Fixierungs- und Andauungstechniken sind bei der Verwendung von Kryostatschnitten nicht erforderlich. Daher werden vor allem bei der Anfärbung empfindlicher, intrazellulärer Antigene, wie beispielsweise Ki-67 (s. oben), häufig bessere Ergebnisse erzielt. Zur Analyse von Antigen-Koexpression auf einer Zelle bieten sich Doppelfärbungen an. Gefrierschnitte sind hierfür ein geeignetes Ausgangsmaterial (*van der Loos, 1999*).

Als Fixativ wurde Aceton verwendet, da es im Gegensatz zu anderen Reagenzien Oberflächenantigene auf Leukozyten, die in der Arbeit nachgewiesen werden sollten, nicht zerstört. Ein Nachteil ist allerdings, dass bei der Verwendung von Aceton die Konservierung nicht vollständig ist, und es deswegen vor allem bei zeitaufwendigen Färbemethoden zu morphologischen Veränderungen im Präparat kommen kann. Trotzdem wird ein Kompromiss zwischen Erhaltung der Antigene durch milde Fixiermethodik und Schonung der Morphologie durch ausgiebige Fixierung bei Kryostatschnitten mit Aceton erreicht (*Boenisch, 2001*). Informationen zu alternativen, besseren Fixiermethoden lagen mir zum Zeitpunkt der Gewebefixierung leider nicht vor.

## 5.3. Ausprägung des T-Zellinfiltrats und funktionelle Beschreibung anhand von Oberflächenmarkern

In der immunhistologischen Beurteilung helfen der Nachweis von Oberflächenmarkern bzw. die Expression von funktions-assoziierten Proteinen, Rückschlüsse auf Zellfunktionen zu ziehen. Dies soll auch bei der Charakterisierung des T-lymphozytären Infiltrats beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem im Bezug auf Funktionsmuster und damit verknüpfte Zytokinsekretion diskutiert werden.

Wie bereits unter Kapitel 2.1 erwähnt, kann man aktivierte T-Lymphozyten gemäß ihres Zytokinsekretionsmusters in Th1, Th2 und Th0 Zellen einteilen, wobei Th1 Zellen unter anderem IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\beta$  produzieren und Th2 Zellen durch die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 gekennzeichnet sind. Beide Zelltypen produzieren IL-3, TNF $\alpha$  und GM-CSF. Als Th0 Zellen werden solche Typen bezeichnet, die sowohl Th1 als auch Th2 Zytokine ausschütten, damit also als Vorläufer oder Zwischenformen der beiden polarisierten Gruppen anzusehen sind (*Kelso, 1995; Mosmann, 1987; Romagnani, 1991*).

Zunächst wird ein kurzer Überblick über die aktuelle Literatur gegeben.

Die Rolle von Zytokinen beim allergischen Kontaktekzem ist bis heute nicht im Detail geklärt. Viele Autoren haben sich bereits mit diesem Thema beschäftigt, allerdings zeichneten sich relativ früh widersprüchliche Ergebnisse ab. Einerseits findet man in der Literatur die Aussage, dass es sich beim allergischen Kontaktekzem um eine Th1 Antwort im Rahmen einer Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH) handelt (*Kapsenberg, 1992; Tscopoulos, 1992*).

Im Gegensatz dazu haben einige Arbeitsgruppen die Ausschüttung von Th2 Zytokine bei Nickelallergikern nachweisen können, wobei vor allem IL-4, welches in hohem Maße in Gewebeproben aus allergischem Kontaktekzem nachgewiesen werden konnte, im Mittelpunkt der Studien stand (*Asada, 1997; Borg, 2000; Rowe, 1998; Werfel, 1997; Xu, 1996*). Manche Autoren interpretieren diese Tatsache dahingehend, dass eine IL-4 Produktion als Gegenregulation zu IFN $\gamma$  anzusehen ist. Also wird die Genese des allergischen Kontaktekzems negativ beeinflusst und IL-4 als „Downregulator“ und Schutzmediator vor überschießender Reaktion angesehen (*Asada, 1997; Xu, 1996*). Andere meinen, die Anwesenheit von Th2 oder Th0 Zellen deutet auf einen Beitrag teilweise mastzellgesteuerter Effekte zur Entstehung des entzündlichen Infiltrats hin (*Rowe, 1998*). Borg et al. vertreten die Hypothese, dass IL-4 einen wesentlichen Faktor bei der Entwicklung der typischen Kontaktekzemmorphologie darstellt (*Borg, 2000*). In einer Arbeit von Werfel et al. findet eine Unterscheidung zwischen untersuchten T-Zellklonen aus dem Blut und aus der Haut statt. So produzieren sowohl CD4 $^{+}$  als auch CD8 $^{+}$  Zellen der Dermis und Epidermis wesentlich höhere Mengen an IL-4 als Blutzellen und dies teilweise auch in Kombination mit IFN $\gamma$ , wodurch sie also als Th2 bzw. Th0 Zellen

charakterisiert werden können. T-Lymphozyten aus dem Blut zeichnen sich dagegen über ihre Zytokinsekretion (IFN $\gamma$  allein oder in Kombination mit IL-4) als hauptsächlich Th1, zum Teil auch Th0 ab. Werfel et al. gehen hierbei also von einer Kompartimentierung der Immunantworten aus, wobei die Hautreaktion als eher Th2 dominant beschrieben wird (*Werfel, 1997*).

Die widersprüchlichen Ergebnisse der einzelnen Studien zeigen, dass man bezüglich des Zytokinmusters im Sinne einer Th1 oder Th2 Dominanz noch keine genauen Aussagen treffen kann. Deshalb habe ich mich ebenfalls mit diesem Thema auseinandergesetzt.

In dieser Arbeit findet die funktionelle Einordnung des T-zellulären Infiltrats anhand der Charakterisierung von Oberflächenmarkern statt. Schon im Kapitel 2.1.2. wurde besprochen, dass bestimmte Chemokinrezeptoren einen Hinweis geben auf die vorherrschende T-Zelltypisierung. So finden sich die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 auf Th1 Zellen, wohingegen Th2 Zellen CCR2, CCR3, CCR4 und CXCR5 auf ihrer Oberfläche tragen (*Novak, 1999; Kaplan, 2001; Loetscher, 1989*). Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die T-Lymphozyten genauer zu charakterisieren. Der Nachweis von CCR5 diente der Zuordnung einer Zelle zum Th1 Phänotyp. Die Methode hat zum Vorteil, dass sie relativ einfach in der Immunhistochemie angewandt werden kann. Als nachteilig ist allerdings anzuführen, dass sie nicht absolut spezifisch ist. So führen beispielsweise *Ødum et al.* an, dass auch CCR5 negative (CCR5-) Zellen sich teilweise durch ein Th1-Zytokinmuster charakterisieren lassen können (*Ødum, 1999; Yamamoto, 2000*). Dies bedeutet, dass die Abwesenheit von CCR5 eine Th1 Antwort nicht ausschließt. Hingegen ist die Anwesenheit von CCR5 ein sehr starker Hinweis darauf, dass es sich bei der Zelle um eine Th1 Zelle handelt, weil der Rezeptor auf Th2 Zellen nicht vorhanden ist. Man kann mit dem CCR5-Nachweis also nur eine „Positivaussage“ machen. Es bestünden zwar Möglichkeiten, Zytokine wie IFN $\gamma$  oder IL-4 direkt immunhistochemisch in den Gewebeschnitte nachzuweisen, so wie es von manchen Forschungsgruppen auch durchgeführt wird. Allerdings ist diese Form der Darstellung umstritten, da es bei den verschiedenen Färbeschritten häufig zur Auswaschung von freien Zytokinen kommen kann. Dadurch besteht vor allem bei geringen Zytokinmengen die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses.

Im Wesentlichen ergab die immunhistologische Untersuchung folgendes Ergebnis: CCR5 war in den Gewebeschnitten auf 53% der Infiltratzellen nachweisbar. Lediglich in der Probe X9 konnte CCR5 nicht nachgewiesen werden. Man muss bei der Beurteilung der Ergebnisse beachten, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sehr ausgeprägt sind. Am Beispiel der CCR5 Färbung im Kollektiv der Patienten mit Nickelkontaktallergie sieht man Prozentwerte zwischen 0 und 74%. Selbst wenn man die Probe X9 ausklammert, ist die Bandbreite der Ergebnisse noch relativ groß. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre beispielsweise, dass schon bei Entnahme der Hautproben Unterschiede in der Ausprägung der klinischen Reaktion zu sehen waren. Auch variierten die Zeitintervalle zwischen ECT Beginn und Probeentnahmen zum Teil um Stunden. In einem größeren Patientenkollektiv könnte man gegebenenfalls beurteilen, ob es generell Patienten gibt, bei denen keine CCR5 Expression auftritt oder ob Probe X9 auch hier ein Einzelfall wäre und damit als nicht repräsentativ gewertet werden könnte.

Fasst man die Färbeergebnisse zusammen, kann man sagen, dass CCR5 mit durchschnittlich 53% (bzw. 59%, sofern man X9 als nicht repräsentativ erachtet) gehäuft in den Proben zu finden ist, wobei deutliche interindividuelle Unterschiede bestehen. In Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen CCR5 und CD4 konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Koexpression der beiden Moleküle bei 66% der CD4+ Zellen auftritt. Bereits in den Einfachfärbungen konnte man sehen, dass CCR5 nahezu ausschließlich auf Zellen innerhalb des T-lymphozytär dominierten Infiltrats exprimiert ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den CD4-CCR5+ Zellen zu einem großen Teil um CD8+ Zellen handelt. Für das Rechenbeispiel wird vereinfachend vorausgesetzt, dass CCR5 *ausschließlich* auf T-Lymphozyten exprimiert ist. Dann wäre der Anteil der CD3+ Zellen, die CCR5 auf ihrer Oberfläche tragen 68%. In Wirklichkeit ist dieser Wert wahrscheinlich kleiner, da es auch vereinzelt Zellen gibt, die CCR5+ sind, aber keine Lymphozyten. Trotzdem kann man annehmen, dass der dominierende Anteil der T-Lymphozyten CCR5+ ist und somit der Th1 bzw. Tc1 Gruppe zugeordnet werden kann, da CCR5 auf Th2 und Tc2 Zellen nicht vorkommt. In diesem Zusammenhang soll nochmals die zeitliche Einordnung der Gewebebegewinnung angesprochen werden. Die Probiopsien wurden alle zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Reaktion (72 Stunden nach Provokationsbeginn) entnommen. Aufgrund der erhobenen Daten kann man

feststellen, dass die betrachtete zeitliche Phase des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems von einem Th1/Tc1 Zytokinmuster dominiert wird.

Als Vergleichsgewebe wurden Stanzbiopsien aus Plaques entzündlicher Psoriasis vulgaris untersucht. Bei der Psoriasis handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion mit dominierendem Th1 Muster (*Schlaak, 1994*). Die gewonnenen Hautschnitte wurde nun ebenfalls auf eine CCR5 Expression hin überprüft. Hierbei kam ich zu dem Ergebnis, dass der relative Anteil der CCR5 positiven Zellen am Infiltrat vergleichbar war mit dem in den Ekzemgeweben. Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass es sich beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem um eine Th1 dominierte Antwort, ähnlich der Psoriasis, handelt. Als Ausblick wäre an dieser Stelle die Frage interessant, ob es beispielsweise in zeitlich späteren Stadien des Kontaktekzems (> 72 Stunden) oder sogar im chronischen Verlauf der Erkrankung zu einer Änderung der Th Dominanz kommt.

Über das vorherrschende Th1 Zytokinmuster kann darauf geschlossen werden, dass die dominierenden Zytokine im untersuchten Gewebe IFN $\gamma$  und IL-2 sind. Diese funktionelle Einordnung der Reaktion spielt eine wichtige Rolle, da dem Zytokinmilieu auch ein Einfluss auf Apoptose, Zelleinwanderung und Keratinozytenproliferation zugesprochen wird. Diese Aspekte werden im weiteren Verlauf der Diskussion zur Sprache kommen.

Nun haben trotz alledem einige Autoren eine deutliche IL-4 Sekretion nachweisen können. IL-4, welches von Th2 und Tc2 Zellen sowie zusätzlich von Th0 Zellen sowie Mastzellen und basophilen Granulozyten ausgeschüttet wird (*Burmester, 1998; Mosmann, 1987; Oethinger, 1997*), übernimmt eine Doppelrolle in der Immunregulation. Zum einen ist es der Hauptinduktor der Th2 Antwort und zusammen mit IL-10 ein Hemmfaktor auf die Entwicklung einer zellvermittelten allergischen Reaktion (*Asada, 1997; Berg, 1995; Enk, 1992; Xu, 1996*). Zum anderen ist es aber auch in der Lage, die IL-12 Produktion voran zu treiben und damit die Polarisierung in Richtung Th1 zu bewirken (*Hochrein, 2000*). Im Rahmen des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems konnte von vielen Autoren eine IFN $\gamma$  Präsenz nachgewiesen werden (*Kapsenberg, 1992; Cavani, 1998; Thomas, 1999*). Wenn nun dieses Th1 Milieu durch die Ausschüttung von IL-4 (zum Beispiel aus Th2 Zellen) ergänzt wird, treibt die Kombination von IL-4 und IFN $\gamma$  laut einer von Hochrein

et al. aufgestellten Theorie die Sekretion von Th1-Zytokinen noch voran (*Hochrein, 2000*). Diese Theorie erscheint sinnvoll, weil dadurch die teilweise hohen IL-4 Spiegel (*Asada, 1997; Borg, 2000; Rowe, 1998; Werfel, 1997; Xu, 1996*) und die durch CCR5 nachgewiesenen Th1 Zelldominanz miteinander vereinbar werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass im Falle des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems Th1 Lymphozyten den dominierenden Funktionstyp darstellen. Präzisere Aussagen zu treffen ist sicherlich nicht sinnvoll, da Th1 und Th2 die polarisierten Formen der Einteilung darstellen und eine Vielzahl von Zwischenformen mit gemischten Zytokinexpressionsmustern existieren. So kritisiert beispielsweise Anne Kelso die Reduzierung der T-Lymphozyten auf die beiden Extremformen. Sie vertritt den Standpunkt, dass es die verschiedensten Zytokinsekretion-Kombinationen gibt und dadurch mehr als zwei polarisierte Formen existieren (*Kelso, 1995*). Gemäß dieser Tatsache wäre es also in unserem Fall möglich, dass eventuell sogar ein und dieselbe Zelle IFN $\gamma$  und IL-4 produziert.

#### **5.4. Zellproliferation als Hinweis auf Allergen-induzierte Aktivierung**

Bezüglich Proliferation sind im histologische Schnittpräparat eines allergischen Kontaktekzems grob zwei wesentliche Bereiche von Bedeutung: einerseits die epithelialen Strukturen der Epidermis mit den dazugehörigen Haarwurzeln und andererseits das dermale T-zelluläre Infiltrat (*Braun-Falco, 1996*). Als Vergleichsgewebe wurden die Hautproben der Psoriasispatienten und die Biopsien der Personen ohne klinische Reaktion nach Nickelexposition im ECT verwendet.

Zunächst zur Psoriasis: Ein wesentliches histologisches Kriterium dieser Erkrankung ist die Akanthose, welche mit einer Verlängerung und kolbenförmigen Auftreibung der Reteleisten einhergeht. Grund hierfür ist eine Hyperproliferation vor allem in den basalen Zellschichten des Epithels (*Braun-Falco, 1996; Nasemann, 1982; Ando, 1990*).

Da Ki-67 ein Protein darstellt, welches ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus vorhanden ist, eignet es sich ideal als Proliferationsmarker einer Zellpopulation (*Scholzen, 2000*).

In den immunhistologischen Untersuchungen der positiven ECT-Areal-Stanzbiopsien mit dem Antikörperklon MIB-1 gegen Ki-67 wurden folgende Ergebnisse erhoben:

Es wurden sowohl im epidermalen Stratum germinativum als auch innerhalb der perivaskulären Infiltrate mittelgradige Proliferationsaktivitäten festgestellt. Bei der Interpretation dieses Sachverhalts muss man beide Zellkompartimente separat voneinander betrachten.

Proliferation innerhalb des T-lymphozytären Infiltrats: Wenn man zu Grunde legt, dass es sich beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem um eine Th1 dominierte Immunantwort handelt, ist davon auszugehen, dass es zu einer IL-2 Ausschüttung ins Gewebe kommt (*Mosmann, 1987*). Dieses Zytokin ist der wichtigste auto- und parakrine Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten, weshalb es auch ursprünglich T-cell-growth-factor (TCGF) genannt wurde. IL-2 wird von aktivierten T-Lymphozyten selbst produziert und führt bei diesen zur Proliferation und zur weiteren Zytokinproduktion, beispielsweise  $\text{IFN}\gamma$  (positives Feedback); bei NK-Zellen bewirkt es ebenfalls Wachstum und Aktivierung (*Abbas, 2000; Burmester, 1998; Oethinger, 1997*).

Anhand der Ki-67 Färbungen ließ sich sowohl in den Kontaktekzem-, wie auch in ähnlichem Ausmaß in den Psoriasisproben eine Proliferation innerhalb des T-zellulären Infiltrats nachweisen im Gegensatz zu den klinische reaktionslosen Kontrollgeweben. Es wurden Proliferationsraten von 33% bei den Nickelallergikern und 35% bei den Psoriasispatienten gesehen. Davon unterschied sich deutlich die Gruppe der Nichtallergiker mit 5%. Die Aktivierung durch inflammatorische Mediatoren spielt bei dieser Beobachtung wohl die entscheidende Rolle. Ein wesentlicher T-lymphozytärer Wachstumsstimulus dürfte in diesem Fall das Th1 typische IL-2 sein, welches zusätzlich autokrin wirksam ist. Da IL-2 in den Kontrollgeweben fehlt, entfällt somit auch der Proliferationsreiz.

Proliferation innerhalb der Epidermis: Die nachgewiesene Proliferation in der epidermalen Basalzellschicht und den basalen Lagen des Stratum spinosum beim Kontaktekzem ist zwar mit 39% im Vergleich zur Psoriasis (59%) nur mäßig ausgeprägt, allerdings finden sich in der klinisch reaktionslosen Haut in diesen

Schichten nur 10% Zellen, welche sich in einer aktiven Phase des Zellzyklus befinden. Bei den Nickelallergikern fallen die Proben X9 und X2 durch relativ hohe Proliferationsaktivität etwas aus dem Rahmen. Die Ergebnisse bei der Psoriasis und den Nichtallergikern sind im Vergleich homogener. Trotz der eher weit gestreuten Ergebnisse im Nickelallergikerkollektiv wird der Unterschied zwischen den entzündlich veränderten Hautproben (Psoriasis und Nickelallergiker) und der klinisch reaktionslosen Haut deutlich. Es liegt wiederum der Schluss nah, dass die inflammatorische Reaktion für das Phänomen der Proliferationssteigerung verantwortlich ist. Bei der postulierten Th1 Dominanz wären hohe  $IFN\gamma$  Spiegel eine mögliche Ursache für Keratinozytenwachstum. Bereits 1990 konnte demonstriert werden, dass in die Haut injiziertes  $IFN\gamma$  lokal zu Keratinozytenproliferation führt (*Fierlbeck, 1990*). Von Valyi-Nagy et al. wurde beschrieben, dass sowohl  $INF\gamma$  als auch  $TNF\alpha$  die Expression von epidermal growth factor / transforming growth factor (EGF/TGF)- $\alpha$  Rezeptoren und TGF- $\alpha$  selbst durch Keratinozyten induzieren können. Einwirkung von TGF- $\alpha$  auf Keratinozyten bewirkt im übrigen nicht nur ein Wachstum, sondern auch eine endogene TGF- $\alpha$  Produktion und ist somit neben IL-1 und IL-6 als ein autokriner Wachstumsfaktor der Keratinozyten anzusehen (*Gottlieb, 1990; Valyi-Nagy, 1992*). Somit sind  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  als Wegbereiter für epidermale Proliferation anzusehen. Mit dieser Proliferationssteigerung geht eine Epidermisverdickung (Akanthose) einher, die auch in verstärkte Schuppung münden kann. Beide Phänomene beobachtet man vor allem bei chronischen Ekzemen, bei denen die Hyperproliferation längere Zeit andauert (*Nasemann, 1882; White 1990*).

Eine vermehrte Epidermis-Proliferation kann als „Abwehrreaktion“ im Kontext der allergischen Entzündungsreaktion gegen das Kontaktallergen (hier Nickel) interpretiert werden. Entstandene „Epidermisschäden“ sollen dadurch repariert werden. Zusätzlich erfolgt der Aufbau einer Schutzbarriere. Darauf weist auch die stark erhöhte Synthese von Defensinen am Beispiel der Psoriasis hin (*Schröder, 1999*).

Sofern beim allergischen Kontaktekzem der Auslöser nur phasenweise an die Haut kommt, ist der Entzündungsvorgang selbstlimitierend. Dadurch verschwindet auch der Proliferationsstimulus. Persistierender Allergenkontakt kann aber zu einer Chronifizierung des allergischen Kontaktekzems führen. Typische histologische Phänomene sind hierbei Akanthose, Hyperkeratose und Schuppung (*Nasemann,*

1982). Der durch chronische Entzündung persistierende Proliferationsstimulus führt bei der Psoriasis zu Hyperproliferation und damit ebenfalls zur typischen Akanthose und Hyperkeratose (Nasemann, 1982; Fierlbeck, 1990). Auch wenn für die Psoriasis ebenfalls eine antigen-getriggerte T-Zellreaktion postuliert wird, so steht der Antigennachweis noch aus. Kreuzreaktivität zu bakteriellen Antigenen wurde für isolierte T-Lymphozyten aus Psoriasisarealen allerdings bereits gezeigt (Prinz, 2004).

### **5.5. Adhäsionsmoleküle als Hinweis für Ekzem-assoziierte Zellrekrutierung**

Die Auswanderung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem ins Gewebe unterliegt zwei Phasen: Erstens die relativ labile Interaktionen von endothelialen Selektinen und deren Liganden auf den Zielzellen; zweitens die Integrin-vermittelte definitive und stabile Anheftung an die Gefäßwand mit anschließender Auswanderung ins Gewebe (Bevilacqua, 1993). So wurden in der vorliegenden Arbeit im Bezug auf den ersten Punkt E-Selektin (CD62E) und CLA untersucht; ICAM-1-Expression diente zur Charakterisierung des zweiten.

Bei den immunhistologischen Untersuchungen konnten folgende Daten erhoben werden: E-Selektin war in klinisch reaktionsloser Haut nicht nachweisbar und in den Psoriasis-Herden nur diskret ausgeprägt. Dagegen waren in den mit Ekzem reagierenden ECT-Arealen in 7 Proben alle im Schnitt vorhandenen kleinen Gefäße positiv angefärbt. CLA-positive Zellen konnten im Infiltrat bei Psoriasis mit 24% wie auch bei Kontaktallergie mit 54% nachgewiesen werden, in der Kontrollhaut nicht (0%). Auch bei den Ergebnissen zur CLA Färbung sieht man relativ starke interindividuelle Unterschiede, wobei vor allem die Proben X3 und X7 herausstechen. Trotzdem sind wiederum die Unterschiede zwischen den Kollektiven deutlich zu erkennen. Im Durchschnitt wird CLA bei den fünf Psoriasispatienten seltener exprimiert als bei den Nickelallergikern. Das komplett negative Ergebnis der Nichtallergikergruppe stellt einen klaren Unterschied zu den anderen Kollektiven dar. ICAM-1-Expression war beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem sowohl auf der Endotheloberfläche als auch innerhalb der Epidermis häufig vorhanden, gleiches zeigte sich bei den Psoriasisgeweben. Dagegen konnte in der klinisch gesunden Haut wenig ICAM-1-Expression gefunden werden. Die Ergebnisdifferenzen bei der ICAM-1 Färbung sind bei allen Gruppen relativ klein.

E-Selektin-Expression auf der Oberfläche des Endothels wird unter anderem gesteuert über den Einfluss von IL-1 und TNF $\alpha$ . Somit ist sie an einen Entzündungsvorgang gekoppelt, wie auch die im Kontrollgewebe fehlende E-Selektin-Expression zeigt. Beide Zytokine, IL-1 und TNF $\alpha$ , werden im Rahmen eines allergischen Kontaktekzems schon relativ früh (ab 6 Stunden) von den Keratinozyten produziert. Somit sind in erster Linie die Keratinozyten selbst für die Initiierung der Lymphozytenauswanderung verantwortlich (*Barker, 1992*). Ohne weitere Zytokineinflüsse würde E-Selektin allerdings nach ein bis zwei Tagen wieder abgebaut werden (*Bevilacqua, 1993*). Doch in den untersuchten Stanzbiopsien war auch ca. 72 Stunden nach Nickelprovokation eine sehr deutliche CD62E-Expression vorhanden. Da allerdings IFN $\gamma$  das Aufrechterhalten einer E-Selektin-Expression zugeschrieben wird (*Bevilacqua, 1993*), könnte dies bei der kontaktallergischen Reaktion in Entsprechung zu einer Th1-dominierten Entzündung als Ursache vorliegen. Die Persistenz von CD62E stellt damit einen indirekten Hinweis auf einen Th1-Typ der Entzündung dar. Die klassische Zielzelle von CD62E ist der neutrophile Granulozyt (*Bevilacqua, 1993; Picker, 1991*). Darüber hinaus können gerade auch CLA<sup>+</sup> T-Lymphozyten adhäreren (*Picker, 1991*). Die im Gegensatz zum allergischen Kontaktekzem relativ geringe CD62E Ausprägung in den Psoriasisproben könnte in der hier chronischen Entzündungsreaktion liegen.

Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) ist ein Protein auf Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen, welches als „skin homing receptor“ spezifisch für die Einwanderung in die Haut verantwortlich ist (*Akdis, 2000; Babi, 1995; Fuhlbrigge, 1997; Picker, 1991*). Manche Autoren zeigten, dass nur Th1 Zellen CLA exprimieren können (*Lim, 1999*). So soll die Anwesenheit von IL-4 die Expression von CLA inhibieren. Andere Autoren berichten von einer CLA Expression unabhängig vom T Zellphänotyp (*Akdis, 2000*).

In ihrer Arbeit diskutieren Akdis et al., dass zwar ein Großteil der CLA<sup>+</sup> Zellen ein Th1 Muster zeigt, dass aber durch die Einwirkung von IL-12 auch Th2 Zellen diesen Rezeptor exprimieren können. Allerdings sei hier anzumerken, dass eine IL-12 Präsenz bei Th2 Zellen dazu führt, dass die IL-4 Produktion gehemmt und statt dessen IFN $\gamma$  sezerniert wird, wobei IL-5 und IL-13 unbeeinflusst bleiben (*Burmester,*

1998; Hochrein, 2000, Trautmann, 2000). IL-12, welches von Langerhanszellen, Makrophagen, Eosinophilen und vor allem Keratinozyten produziert wird, stellt den stärksten Induktor der Th1 Differenzierung dar (Müller, 1994). Bei Th2 Zellen führt es zu einem gemischten Sekretionsmuster, was dann allerdings definitionsgemäß einem Th0 Milieu entsprechen würde (Mosmann, 1987). Das bedeutet, dass man über eine starke Präsenz von CLA die Dominanz einer Th2 Antwort ausschließen kann. Bei einer CLA Expression von durchschnittlich 54% bei den Nickelallergikern kann man sagen, dass durchschnittlich 69% der Lymphozyten CLA+ sind (CLA wird definitionsgemäß nur auf Lymphozyten exprimiert). Somit stellt die nachgewiesene starke CLA Expression wiederum einen Hinweis für die Th1 Dominanz beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem dar. Bei der Begutachtung einzelner Konsekutivschnitte konnte anhand von exponierten, leicht zu identifizierenden Zellen auch gesehen werden, dass CLA ebenfalls auf CD8+ Zellen vorkommen kann. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass auch diese Zellpopulation über spezifische Rezeptoren verfügt, die eine gezielte und effektive Migration in ein entzündliches Hautareal ermöglichen.

Intercellular adhesion molecule-1 ICAM-1 wurde im Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem sowohl auf dem Endothel als auch in der Epidermis stark ausgeprägt nachgewiesen. Der Ligand auf den Lymphozyten ist das lymphocyte function-associated antigen-1 LFA-1 (Babi, 1995). ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle in der stabilen Interaktion von Lymphozyten mit der Gefäßwand, sodass der Migrationsvorgang anschließend stattfinden kann (Vestweber, 2001). Als chemotaktisch aktive Faktoren fungieren Zytokine, welche von Keratinozyten produziert werden, zum Beispiel IL-1, IL-6 und IL-8 (Barker, 1992). Diese führen zu einer Wanderung der T-Lymphozyten entlang des ansteigenden Konzentrationsgradienten. Um nun zu ermöglichen, dass die T-Zellen das Gefäß an der Stelle der höchsten Zytokinkonzentration verlassen können, ist ICAM-1 von entscheidender Bedeutung. ICAM-1-Expression auf den Keratinozyten führt dazu, dass die T-Zellen direkt in die Epidermis einwandern können, wie man im histologischen Präparat auch sehen kann. Interessant ist an dieser Stelle wiederum der Zusammenhang mit dem Zytokinmilieu. ICAM-1 wird beim allergischen Kontaktekzem auf Keratinozyten in einer frühen Phase (nach ca. 6 Stunden) unter Stimulation von IFN $\gamma$  exprimiert (Barker, 1992). Auch von Keratinozyten selbst

produziertes IL-1 führt zur transkriptionellen Induktion von ICAM-1. (Vestweber, 2001).

Auffällig ist, dass in allen fünf Stanzbiopsien von klinisch reaktionsloser Haut eine geringe ICAM-1 Expression gefunden wurde. E-Selektin fand sich hingegen nicht. Es stellt sich die Frage, ob dieses Phänomen als irritative Nickel-induzierte Veränderung gedeutet werden kann. Darauf weisen *in-vitro*-Versuche hin, bei denen in Endothelzellkulturen nach Nickel- oder Kobaltzugabe eine ICAM-1-Expression gefunden wurde (Goebeler, 1993). Unabhängig von dem Allergiestatus der jeweiligen Person würde so eine gewisse Zellauswanderung ermöglicht. Nun wurden ja in den untersuchten Kontrollgeweben diskrete, aber durchaus vorhandene perivaskuläre Lymphozytenansammlungen gesehen. Durch die Nickel induzierte, diskrete ICAM-1-Expression würde so die Lymphozytenmigration gebahnt. Dass die ICAM-1-Expression bei entsprechender allergischer Entzündung dann weiter hochreguliert wird, lässt sich anhand meiner Ergebnisse vermuten.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem die Interaktion von E-Selektin und CLA eine wesentliche Rolle bei der Lymphozytenadhäsion spielt und zu einer gezielten Lenkung der Entzündungszellen an die entsprechende Hautregion führt. ICAM-1 mit seinem Liganden ermöglicht eine feste Adhäsion sowohl am Endothel als auch an den Keratinozyten. Es bestehen Hinweise darauf, dass vor allem Zytokine, welche einerseits von Keratinozyten selbst, andererseits von Th1/Tc1 Lymphozyten ausgeschüttet werden, bei der Entstehung dieses Migrationsmechanismus eine weichenstellende Rolle spielen. Auch Nickel an sich hat schon eine ICAM-1-induzierende Wirkung.

## **5.6. Die Rolle der Apoptose bei der Entstehung des klinischen Bildes des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems**

Apoptose stellt als Gegenwirkung zur Zellproliferation einen wichtigen physiologischen Mechanismus der epidermalen Homöostase dar (Laporte, 2000). Aber auch in der Entstehung und Aufrechterhaltung von pathologischen Prozessen spielt sie eine gewisse Rolle. In der Dermatologie gilt dies beispielsweise für Lichen

ruber planus, M. Darier, Graft-versus-host-Reaktionen oder Pathomechanismen des UV-Licht-induzierten Sonnenbrandes (*Weedon, 1979*).

Apoptotische Aktivität im Bezug auf das Nickel-induzierte allergische Kontaktekzem zu beschreiben war ein Ziel dieser Arbeit. In den Färbungen mit Mab gegen ssDNA konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Kontrollhautproben (Ni-ECT Areal ohne klinische Reaktion), in denen teils gar keine, teils äußerst spärlich apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten (Durchschnittswert 0% (0,4%) epidermal, 0% (0,4%) dermal), der Anteil der epidermal und im Infiltrat stattfindenden Apoptose in den Kontaktekzem-Geweben mit jeweils 2% (bzw. 2,4% und 2,3%) deutlich gesteigert war. Auch bei den Psoriasisproben ergaben sich in beiden Bereichen erhöhte Werte (epidermal 1% (0,6%) und dermal 1% (0,8%)), wenn auch nicht so hoch wie bei den Ekzembiospien. Alle Werte lagen zwischen 0 und 5% und somit innerhalb der möglichen biologischen Toleranz. Doch es zeichnet sich trotzdem ein quantitativer Unterschied zwischen den Proben der Nickelallergiker und einerseits und den beiden Kontrollgruppen andererseits ab. Des weiteren zeigte sich auch ein qualitativer Unterschied: Die Lokalisation der in Apoptose befindlichen Zellen war unterschiedlich. Sowohl in verschiedenen Studien als auch in meiner Färbeserie konnte gezeigt werden, dass in normaler Haut Apoptose lediglich im Stratum corneum zu finden ist und dort auch nur in geringer Ausprägung (*Laporte, 2000; Norris, 1997*). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass Keratinozyten, vor allem diejenigen im Stratum germinativum, einen Schutzmechanismus gegen Apoptose haben. Dieser wird allerdings durch Differenzierung der Zellen oder Entzug von Wachstumsfaktoren geschwächt (*Norris, 1997*). Vor allem in den Probenbiopsien der Patienten mit Nickel-induziertem allergischen Kontaktekzem, vereinzelt auch bei den Psoriasisproben waren auch Zellen im Stratum germinativum apoptotisch.

Meine Ergebnisse unterscheiden sich von denen einer Veröffentlichung durch Trautmann et al. (*Trautmann, 2000*). Bei deren Arbeit wurde eine wesentlich höhere Apoptoserate festgestellt. Der Grund hierfür ist eventuell darin zu sehen, dass Trautmann et al. eine andere Methodik einsetzten, nämlich die in-situ-Hybridisierung mittels TUNEL-Assay. Diese Nachweismethode hat den Nachteil, dass auch nicht-apoptotische Zellen mit DNA-Brüchen erfasst werden. Ich hatte die spezifische ssDNA-Darstellung gewählt und dadurch vermutlich niedrigere Apoptoseraten

bestimmt. Doch kann trotzdem übereinstimmend gesagt werden, dass die Apoptoserate beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem gegenüber der Kontrollhaut gesteigert und außerdem in Regionen nachzuweisen ist, die normalerweise vor dem programmierten Zelltod geschützt sind (Stratum germinatum).

Auch hier sollte man, ähnlich wie bei der Proliferation, das größtenteils T-lymphozytäre Infiltrat und die Epidermis getrennt voneinander betrachten.

In den Biopsien aus ECT-Arealen mit Ekzemreaktion sieht man eine Apoptoserate von 2% (2,3%) im zellulären Infiltrat, während im Kontrollgewebe keine Apoptose an dieser Stelle (bis auf eine Zelle in Probe A43) nachweisbar war. Auch in der Psoriasischnittserie waren die Werte, widersprüchlich zu einer Studie von Laporte et al. (*Laporte, 2000*), leicht gesteigert. Allerdings hat sich Laporte eher mit der Keratinozytenapoptose befasst und weniger das Infiltrat untersucht. Dies legt den Schluß nah, dass die apoptotischen Phänomene vom Aktivitätsniveau der Zellen abhängig sind.

Ein möglicher hier stattfindender Mechanismus könnte der „activation induced cell death“ (AICD) sein: Dies bedeutet, dass durch die Aktivierung der T-Lymphozyten, welche den Hauptanteil des Infiltrats bilden, diese den Fas Rezeptor (FasR, CD95) exprimieren und gleichzeitig aber auch Fas Ligand (FasL) auf einigen dieser Zellen vorhanden ist. Dadurch kommt es innerhalb des Infiltrats zu einer FasR-FasL medierten Apoptose (*O' Conell, 2001; Sharma, 2000; Walczak, 2000*). Um dies zu hinterfragen, wurde auch die FasR- und FasL-Expression in meinen Schnitten untersucht. Sowohl im Infiltrat als auch im Epithel war FasR mit 69% bzw. 53% hoch exprimiert, FasL hingegen nur selten oder zum Teil gar nicht zu finden. Die Expression von FasR im Infiltrat ist wahrscheinlich auf einen hohen IFN $\gamma$ -Spiegel zurück zu führen, da dieser Mediator neben TNF einen starken Stimulus für FasR darstellt (*Trautmann, 2000; Walczak, 2000*). Hier ähneln meine Ergebnisse denen von Trautmann et al.. FasL spielt durch seine geringe Präsenz vielleicht nur eine kleine Rolle. Andererseits deutet selbst ein niedriger Spiegel darauf hin, dass der AICD eine Bedeutung für den von mir gefundenen Zelltod innerhalb des Infiltrats hat. Der durch Koexpression von FasR und FasL vermittelte AICD wäre somit eine

Gegenregulation zu Aktivierungs-bedingtem Wachstum und Zytokinproduktion des Infiltrats (*Sharma, 2000*). Bekannt ist dieses Phänomen auch bei der Elimination autoreaktiver T-Zellen während der Selektion im Thymus, wodurch eine Toleranz gegenüber Selbstantigenen aufgebaut wird (*O' Connell, 2001; Sharma, 2000*). Ermöglicht wird AICD nur durch die Interaktion von FasR mit membrangebundenem FasL. Die lösliche Form bindet zwar ebenfalls an FasR, führt aber zu einer Hemmung der Inangsetzung der Caspasekaskade durch FasR und stellt damit einen Apoptoseinhibitor dar (*Sharma, 2000*).

FasL-Expression ist ein relativ streng regulierter Vorgang, weshalb sich der Ligand bisher auch nur auf bestimmten Zellen nachweisen ließ: dazu zählen neben Sertoli-Zellen des Hodens, Cornea Epithel und Retina auch natürliche Killerzellen und aktivierte T-Lymphozyten (*Sharma, 2000; Suda, 1995*). Es bestehen Hinweise darauf, dass die Expression von FasL ebenfalls von IFN $\gamma$  abhängig ist. So beschreiben Trautmann et al. (*Trautmann, 2000*) eine Präsenz von FasL zunächst nur auf Th1 und vereinzelt Tc1 Zellen. Ähnlich wie bei der Proliferationsregulation durch Th1 Zellen konnte auch hier gezeigt werden, dass Th2/Tc2 Zellen nach Stimulation mit IL-12 eine Umverteilung der Zytokinsekretion aufweisen und neben erniedrigtem IL-4 vermehrt IFN $\gamma$  sezernieren (*Burmester, 1998; Hochrein, 2000, Trautmann, 2000*). Dadurch sind diese Zellen, welche jetzt definitionsgemäß der Th0/Tc0 Gruppe zuzuordnen wären, (*Mosmann, 1987*), befähigt, auch FasL zu exprimieren und AICD zu induzieren. Somit sind der AICD und andere Fas-vermittelte Apoptoseformen von der Gegenwart des Th1 Zytokins IFN $\gamma$  abhängig, welches dadurch gleichzeitig Proliferation und Zelltod mediiert. Auch der Wachstumsfaktor IL-2 erhöht die Expression von FasL auf Antigen-stimulierten T-Zellen und führt außerdem zu einer erhöhten Bereitschaft zum AICD. Dies ist also auch wieder ein Hinweis auf eine Dominanz der Th1/ Tc1 Antwort.

Allerdings konnte in manchen meiner Gewebsschnitte aus Ekzemarealen FasL bei vorhandener Apoptose gar nicht nachgewiesen werden. So sollten noch alternative Wege der Apoptoseinduktion in Betracht gezogen werden. Einer davon wird über Granzyme B (GrB) und Perforin gesteuert. Die beiden Proteine agieren gemeinsam in folgender Weise: Perforin und GrB werden von ihren Hauptproduzenten (NK-Zellen und CD8 $^+$  T-Lymphozyten) auf die Zielzellen sezerniert. Dabei bildet Perforin in der Zellmembran der "Opferzelle" Poren, durch die GrB eindringen kann und, wie

bei FasR/FasL-Interaktion, eine Caspasekaskade aktiviert, die mit der Fragmentierung der DNA endet. Es gibt daneben auch noch perforin- und caspaseunabhängige Wege des GrB, die Apoptose zu induzieren. Der Perforin/GrB Weg ist die wichtigste Strategie zur Bekämpfung virusbefallener Zellen (*Virchow jr., 2000*). Allerdings kann er auch im Rahmen des allergischen Kontaktekzems einen alternativen Mechanismus darstellen (*Traidl, 2000*). Es konnte von Yawalkar et al. in nickelallergischen Ekzemarealen immunhistochemisch eine erhöhte Perforin- und Granzym B-Expression auf T-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei es sich sowohl um CD4+ als auch CD8+ Zellen handelte (*Yawalkar, 2001*). In diesem Falle wären dann vermutlich zytotoxische CD8+ Zellen die Effektorzellen (*Virchow jr., 2000*), im Gegensatz zur FasR/FasL-vermittelten Apoptose. Bei letzterer sind Th1 Zellen, also eine Untergruppe der CD4+ die wichtigeren Vermittler (*Trautmann, 2000*). Diesen Vorgang bezeichnet man dann nicht als AICD. Allerdings ist er durchaus damit vergleichbar, denn auch hier führen Zellen des Infiltrats zum Zelltod benachbarter Infiltratzellen. Analog ist ebenfalls eine Aktivierung der CD8+ Zellen notwendig, um Perforin zu exprimieren (*Tsujimura, 1998*).

Folgendes Fazit kann gezogen werden: Im entzündlichen Infiltrat des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems findet sich eine Apotoserate von ca. 2%, die teilweise über einen IFN $\gamma$  abhängigen FasR/FasL medierten AICD zu erklären ist. Allerdings trat Apoptose auch in Abwesenheit von FasL auf. So ist als möglicher zusätzlicher Mechanismus die CD8+ T-Zell-vermittelte Apoptose über GrB/Perforin zu sehen.

Bei der Analyse der Epidermis in Biopsien von allergischem Kontaktekzem zeigte sich eine dem Infiltrat ähnliche Situation. Hier waren ähnlich hohe Apotoseraten zu finden. Durch die Lokalisation im Stratum germinativum unterschieden sie sich auch qualitativ von der Normalhaut. Die Keratinozyten exprimierten in einem hohen Maße den FasR (im Mittel 69%), wahrscheinlich induziert durch den Einfluss von IFN $\gamma$  aus Th1 Zellen. Jedoch war auch hier wieder die FasL Expression nur spärlich (durchschnittlich 5%). Das spricht analog zum Infiltrat dafür, dass der FasR/FasL vermittelte Zelltod nicht den einzigen Mechanismus darstellt. Ein weiterer Punkt ist, dass relativ wenige T-Zellen in die Epidermis eingewandert waren (s. 4.2.1.), zumindest zum Zeitpunkt der Biopsie. Nur der direkte Kontakt von T-Zelle und

Keratinocyten können zur Apoptose über diesen Weg führen, da der lösliche FasL nicht in der Lage ist, über seine Bindung zu einer Aktivierung der Caspasekaskade zu führen. Deshalb ist ein direkter Kontakt zu T-Lymphozyten wesentliche Voraussetzung für die FasR/FasL-vermittelte Apoptose. Dadurch ist IFN $\gamma$  nicht nur für die FasR-Präsentation auf Keratinocyten von zentraler Bedeutung, sondern auch die notwendige ICAM-1- und MHC Klasse II-Molekül-Expression in der Epidermis sind durch das Zytokin getriggert (*Singer, 1989*). Dadurch wird die wichtige Rolle der KC-Aktivierung durch IFN $\gamma$  deutlich, ohne welche ein Zelltod mittels FasR/FasL nicht möglich wäre (*Matsue, 1995; Traidl, 2000*).

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse (geringe Anwesenheit von FasL und eher wenige T-Zellen in der Epidermis) wird deutlich, dass es Alternativen zur Apoptoseauslösung durch FasL geben muss. Ein möglicher Gedanke wäre der, dass im Falle des epidermalen Zelltods eine direkte, toxische Einwirkung von Nickel bestehen könnte. Manome et al. beschreiben einen apoptose-induzierenden Effekt von NiCl<sub>2</sub> auf dendritische Zellen (*Manome, 1999*). Es stellt sich nun natürlich entsprechend die Frage, ob Nickelionen nicht analog auch Keratinocytenapoptose durch toxische Effekte auslösen können. Diese Frage kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse für die im Hauttest verwendeten Nickelkonzentrationen verneint werden. Denn bei den fünf Hautproben der Ni-ECT negativen Areale bestand zwar der gleiche, intensive und direkte Kontakt zwischen den epidermalen Zellen und der Nickeltestpräparation, es konnte allerdings mit 0% (0,4%) keine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu unstimulierter Haut (*Laporte, 2000*) festgestellt werden. Also ist ein toxischer Effekt der Nickelionen hier eher unwahrscheinlich.

An dieser Stelle stellt sich wiederum die Frage nach der Relevanz der GrB/Perforin-medierten Apoptose, welche vor allem durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen mediiert wird. Wahrscheinlich führen mehrere Wege zum Keratinocytenzelltod. Die Bedeutung der zytotoxischen Reaktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen Keratinocyten mittels GrB/Perforin wurde im Fall der Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems bereits von Traidl et al. betont, da in ihren Versuchen Perforin mRNA im Gewebe nachgewiesen werden konnte (*Traidl, 2000*). Yawalkar et al. zeigten eine Perforin- und GrB-Expression bei T-Lymphozyten (*Yawalkar, 2000*). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass auch bezüglich der epidermalen apoptotischen Aktivität analog zum Infiltrat wahrscheinlich

mehrere Induktionswege existieren. Eventuell sind dabei frühe zytotoxische Schädigungen der Epithelzellen eher durch das GrB/Perforin System getriggert, während nach einer Aktivierung der Keratinozyten durch T-zelluläres IFN $\gamma$  im Verlauf der Reaktion der FasR/FasL-Weg in den Vordergrund rückt (*Traidl, 2000, Yawalkar, 2000*). Interessant wäre es, Hautbiopsien eines früheren (24 Stunden) und eines späteren (> 4 Tage) Zeitpunkts mit den hier verwendeten Proben (ca. 72 Stunden nach ECT-Beginn) im Bezug auf Apoptose miteinander zu vergleichen. Vielleicht hängen die Unterschiede der hier gewonnenen Ergebnisse zu denen von Trautmann et al. auch vom zeitlichen Verlauf ab.

In meinen Patientenkollektiven zeigte sich also, dass die epidermale Apoptoserate beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem gesteigert ist verglichen mit den nicht allergischen Probanden. Histologisch stellt sich das Krankheitsbild unter anderem durch Spongiose und Vesikelbildung dar. Diese „Bläschen“ sind teils auch makroskopisch am Schnittpräparat sichtbar. In den erweiterten Interzellularspalten vor allem im Stratum spinosum findet sich ein Ödem (*Braun-Falco, 1996; Burmester, 1998; Nasemann, 1982; Ring, 1991*). Trotzdem bestehen noch wirksame Interzellularkontakte zwischen den Keratinozyten, wie man lichtmikroskopisch bereits feststellen kann. Wenn nun einzelne dieser Keratinozyten in die Apoptose übergehen, kann man sich gut vorstellen, dass die Stabilität des Zellverbundes an dieser Stelle beträchtlich gemindert wird, zumal durch das Ödem sowieso schon eine Zugspannung zwischen den Zellen besteht. Der so entstandene Schaden kann dazu führen, dass durch den Integritätsverlust eine Blase in der Epidermis entsteht. Wahrscheinlich leistet die Apoptose einen wichtigen Beitrag zur Vesiculogenese und somit zu einem charakteristischen Merkmal des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems.

Anders verhält es sich bezüglich der Keratinozytenapoptose bei der Psoriasis. Hier konnte ich keine Verstärkung der apoptotischen Aktivität sehen. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass Keratinozyten in psoriatischen Plaques wohl einen erhöhten Spiegel an Bcl-x<sub>e</sub> aufweisen und somit unempfindlicher sind gegen die Induktion von Apoptose (*Wrone-Smith, 1997*). Das Ergebnis widerspricht zwar teilweise den Aussagen von Laporte et al., die von einer erniedrigten Apoptoserate bei der Psoriasis verglichen mit Normalhaut sprechen (*Laporte, 2000*). Das Fazit von

mir und Laporte et al. ist aber äquivalent: Auch wenn in meinen Untersuchungen nicht unbedingt erniedrigte Werte gesehen wurden, so ist das Apoptoseausmaß im Vergleich zur Proliferationsrate relativ gesehen trotzdem wesentlich niedriger. Übereinstimmend mit Laporte et al. (*Laporte, 2000*) ist dies wohl so zu deuten, dass die Effekte der Hyperproliferation durch die nicht adäquat gesteigerte Apoptose noch zusätzlich verstärkt werden.

## 5.7 Ausblick

Viele experimentelle Daten zur Charakterisierung des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems sind bereits vorhanden, so dass einige pathophysiologische Mechanismen beschrieben werden konnten. Bei der vorliegenden Arbeit wurden bereits sensibilisierte Personen, das heißt Personen mit Nickelkontaktallergie im Vergleich zu nicht-allergischen Personen untersucht. Es konnten ergänzende Aussagen bezüglich der funktionellen Einordnung der T-Zellen im entzündlichen Infiltrat, der Expression von Adhäsionsstrukturen und der Rolle von Apoptose getroffen werden.

In neuester Zeit wurden weitere Chemokine bekannt, die einen Beitrag zur T-Zelleinwanderung in die Haut leisten. Das Chemokin CCL27 (auch CTACK), welches von Keratinozyten in Antwort auf eine Vielzahl von irritativen Signalen produziert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von CLA<sup>+</sup> und CCR10<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut (*Homey, 2002; Morales, 1999*). Es konnte beispielsweise kürzlich für das Krankheitsbild „Alopecia areata“ gezeigt werden, dass CCL27 in den entzündlichen Arealen hoch exprimiert war (*Simonetti, 2004*). Nachforschungen über die Rolle von CCL27 bei der Entstehung des T-Zellinfiltrats beim Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzem stehen meines Wissens noch aus. Zum Zeitpunkt der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit waren leider die diesbezüglichen Immunreagenzien noch nicht verfügbar. So bleibt dieser Aspekt zukünftigen, auf die vorliegende Arbeit aufbauenden Untersuchungen vorbehalten. Ähnliches gilt auch für die Analyse der Rolle regulatorischer CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei Nickel-induziertem Ekzem.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden immunhistologische Charakteristika des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems analysiert. Die Untersuchungen wurden mit Einfach- und Doppelfärbetechnik an Gefrierschnitten von Hautproben durchgeführt, die aus Nickel-ECT-Arealen stammten. Verglichen wurden 10 Personen mit Nickelkontaktallergie (Ekzemreaktion im Nickel-ECT-Feld) und 5 Personen ohne Nickelkontaktallergie (reaktionslose Haut im Nickel-ECT-Feld). Eine vergleichende immunhistologische Untersuchung wurde in dieser Form unseres Wissens noch nicht durchgeführt. Vielmehr diente ansonsten stets unstimulierte Haut als Vergleichsgewebe. Weiteres Kontrollgewebe stammte aus Plaqueearealen von 5 Personen mit Psoriasis vulgaris.

In den Ekzemarealen und den Psoriasisproben fanden sich perivaskuläre Infiltrate, die vor allem aus CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten bestanden. Weitere Untersuchungen der Subtypen ergaben eine Dominanz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Allerdings fanden sich auch in Nickel-exponierter, klinisch reaktionsloser Haut diskrete Herde von meist CD4<sup>+</sup> T-Zellen neben CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Das entzündliche Infiltrat wurde anhand von Oberflächenmarkern funktionell charakterisiert. Der Chemokinrezeptor CCR5 diente hierbei als Indikator für die Gruppe der IL-2- und IFN $\gamma$ -sezernierenden Th1/Tc1 Zellen. Da ein großer Teil der Infiltratzellen in den Ekzemarealen dieses Antigen in einer mit der Th1-Zell-dominierten Psoriasis vulgaris vergleichbaren Quantität exprimierten, wurde von der Dominanz eines derartigen Zytokinmusters ausgegangen. Doppelfärbungen zeigten, dass durchschnittlich 66% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch CCR5<sup>+</sup> waren im Sinne eines Th1-Typs. Der für die Haut typische „homing-receptor“ CLA konnte ebenfalls sowohl in den Ekzem- als auch den Psoriasisplaque-Arealen auf den T-Lymphozyten gefunden werden. Sowohl CCR5 als auch CLA waren in den reaktionslosen Hautproben trotz vorhandener T-Lymphozyten nicht nachweisbar.

Anschließend wurde die Proliferation anhand der Expression des Markers Ki-67 untersucht. Im Vergleich zu den nicht-allergischen Personen war bei den Nickelallergikern die Proliferation sowohl epidermal als auch in den Infiltratzellen gesteigert, jedoch geringer als bei den Psoriasisproben. Dabei kommt der epidermalen Proliferation eine Rolle bei Reparaturmechanismen nach Zell-

schädigung (z.B. durch Apoptose) und beim Aufbau einer Schutzbarriere zu. Proliferation im entzündlichen Infiltrat lässt sich als IL-2-Effekt bei T-Zell-Aktivierung deuten.

Bei der Untersuchung von Adhäsionsstrukturen fiel in den Ekzemearealen im Nickel-ECT-Feld eine deutliche und prolongierte E-Selektin-Expression auf. Dem könnte die bei Th1-dominierter Entzündung vorherrschende IFN $\gamma$ -Produktion zu Grunde liegen. Diese Expression fehlte in Nickel-exponierter, klinisch reaktionsloser Haut und war auch bei Psoriasis nur gering nachweisbar. E-Selektin ist hier typische Leitschiene zur Auswanderung CLA $^+$  T-Zellen. Auch die starke ICAM-1 Expression bei Nickelallergikern sowie bei Psoriasispatienten kann unter anderem durch das Th1 Zytokin IFN $\gamma$  induziert worden sein. Eine alleinige unspezifisch-irritative Nickel-Wirkung scheidet auf Grund der nur geringen ICAM-1-Expression in Nickel-exponierter Haut bei Nichtallergikern aus. Allerdings könnte diese diskrete ICAM-1-Expression bei fehlender E-Selektin-Expression eine unspezifische T-Zell-Einwanderung in den klinisch reaktionslosen Hautbiopsien ermöglicht haben.

Zur Bedeutung von Apoptosephänomenen wurde in der vorliegenden Arbeit die Analyse von Einzelstrang-DNA (ssDNA) über spezifische Antikörper durchgeführt. Mit dieser im Vergleich zum TUNEL-Assay spezifischeren Methode konnte in den Ekzemearealen sowohl epidermal als auch im Infiltrat eine gegenüber den klinisch reaktionslosen Hautproben gering gesteigerte Zelltodrate gefunden werden. Auch die Psoriasisproben zeigten leicht erhöhte Werte. Allerdings kann nicht allein eine über erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion hochregulierte FasR-Expression dies erklären, zumal der dazugehörige Ligand FasL nicht adäquat hoch exprimiert gefunden wurde. Zu diskutieren ist auch der durch CD8 $^+$  T-Zellen medierte GranzymB-Perforin-Weg als Apoptose-Verursacher. Der neben Apoptose-Mechanismen schon vorab einsetzende gegenregulatorische Effekt von CD4 $^+$  CD25 $^+$  T-Zellen konnte bei der Durchführung der Untersuchungen dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt werden.

Zusammenfassend konnten also mit den beschriebenen Methoden Charakteristika des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben die Voraussetzungen geschaffen, um weiterführende Studien, beispielsweise zu Regulationsmechanismen der allergischen Entzündung, in Angriff nehmen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (2000):** Cellular and molecular immunology. 4. Auflage, 2000, Saunders Text and Review Series

**Aberer, W., Kränke, B. (2002):** The new EURO releases nickel and elicits contact eczema. Br J Dermatol, 2002, 146; 155-156

**Akdis, M., Klunker, S., Schliz, M., Blaser, K., Akdis, C.A. (2000):** Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4+ and CD8+ Th2cells. Eur J Immunol, 2000, 30; 3533-3541

**Ando, M., Kawashima T., Kobayashi, H., Ohkawara, A. (1990):** Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody. J Derm Science, 1990, 1; 441-446

**Amagai, M. (1995):** Adhesion molecules. I: keratinocyte-keratinocyte interaction; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol, 1995, 104; 146-152

**Asada, H., Linton, J., Katz, S.I. (1997):** Cytokine Gene Expression during the elicitation phase of contact sensitivity: regulation by endogenous IL-4. J Invest Dermatol, 1997, 108; 406-411

**Babi, S. L. F., Moser, R., Soler, M. T. P., Picker, L. J., Blaser, K., Hauser, C. (1995):** Migration of skin-homing T cells across cytokine activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). J Immunol, 1995, 154; 1543-1550

**Barceloux, D.G. (1999):** Nickel. Clinical Toxicology, 1999, 37(2); 239-258

**Barker, J. N. W. N. (1992):** Role of keratinocytes in allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis, 1992, 26; 145-148

**Berg, D.J., Leach, M. W., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Davidson, N. J., Rennick, D. (1995):** Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med*, 1995, 182; 99-108

**Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M. (1993):** Selectins. *J Clin Invest*, 1993, 91; 379-387

**Boenisch, T., Farmilo, A. J., Stead, R. H., Key, M., Welcher, R., Harvey, R., Atwood, K. N. (2001):** Handbook of immunochemical methods. 3. Auflage, 2001, DAKO corporation

**Borg, L., Christensen, J. M., Kristiansen, J., Nielsen, N. H., Menné, T., Poulsen, L. K. (2000):** Nickel-induced cytokine production from mononuclear cells in nickel-sensitive individuals and controls. *Arch Dermatol Res*, 2000, 292; 289-291

**Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H. H. (1996):** Dermatologie und Venerologie. 4. Aufl., 1996, Springer Berlin Heidelberg New York

**Browder, L., Iten, L. (1998):** A brief introduction to apoptosis. *Dynamic Development*, 1998, <http://www.ucalgary.ca>

**Büdinger, L., Hertl, M., (2000):** Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 2000, 55; 108-115

**Burmester, G.-R., Pezzutto, A. (1998):** Taschenatlas der Immunologie. 1. Auflage, 1998, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

**Cavani, A., Mei, D., Guerra, E., Corinti, S., Giani, M., Pirrotta, L., Puddu, P., Girolomoni, D. (1998):** Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T-cell responses. Evidence for the presence of effector CD8<sup>+</sup> and regulatory CD4<sup>+</sup> T-cells. *J Invest Dermatol*, 1998, 111; 621-628

**O' Connell, J., Houston, A., Bennett, M.W., O' Sullivan, G. C., Shanahan, F. (2001):** Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nature Medicine*, March 2001, Volume 7, Number 3; 271-274

**Cordell, J. L., Brunangelo, F., Wendy, N. E., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H., Mason, D. Y. (1984):** Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes): *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1984, Vol 32, No. 2, 219-229

**Ekert, P. G., Vaux, D. L. (1997):** Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull*, 1997, 53(3); 591-603

**Endl, E., Gerdes, J. (2000):** The Ki-67 protein: fascinating forms and unknown function. *Exp Cell Res* 2000, 257; 231-237

**Enk, A. H., Katz, S. I. (1992):** Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol*, 1992, 149 (1); 92-95

**Fierlbeck, G., Rassner, G., Müller, C. (1990):** Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. *Arch Dermatol*, 1990, 126; 351-355

**Frankfurt, O. S., Krishan, A. (2001):** Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2001, Vol. 49(3); 369-378

**Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbaker, E. V., Villa, L. (1996):** Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res*, 1996, 226; 387-397

**Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Armerding, D., Kupper, T. S. (1997):** Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T-cells. *Nature* 1997, Vol. 389; 978-981

**Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahner, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H.-D. (1991):** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 1991, 138; 867-873

**Goebeler, M., Meinhardus-Hager, G., Roth, J., Goerdt, S., Sorg, C. (1993):** Nickel Chloride and Cobalt Chloride, Two Common Contact Sensitizers, Directly Induce Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), and Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) by Endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 1993, 100; 759-765

**Gottlieb, A. B. (1990):** Immunologic mechanisms in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1990, 95; 18S-19S

**Grevers, G., Röcken, M. (2001):** Taschenatlas der Allergologie. 1. Auflage, 2001, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

**Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E., Shortman, K. (2000):** Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med*, 2000, Vol 192 (6); 823-833

**Hockenbery, D. (1995):** Defining apoptosis. *American Journal of Pathology*, 1995, Vol 146 (1); 16-19

**Homey, B., Alenius, H., Müller, A et al. (2002):** CCL-27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature Med*, 2002, 8; 157-165

**Iseki, S. (1986):** DNA strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation. *Exp Cell Res*, 1986, 167; 311-326

**Kammerer, S. (2001):** Nickel (Ni) in Böse-O'Reilly, Kammerer, Mersch-Sundermann, Wilhelm: Leitfaden Umweltmedizin, 2. Auflage, 2001, Urban und Fischer Verlag, München Jena

**Kane, A. B. (1995):** Redefining cell death. *Am J Pathol*, 1995, Vol 146 (1); 1-2

**Kaplan, A. P. (2001):** Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 124; 423-431

**Kapsenberg, M. L., Wierenga, E. A., Stiekema F. E. M., Tiggeleman, A. N. B. C., Bos, J. D. (1992):** Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+ T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J Invest Dermatol*, 1992, 89; 59-63

**Kelso, A. (1995):** Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunology Today*, 1995, Vol 16 (8); 374-379

**Korkolopoulou, P., Konstaninidou, A., Patsouris, E. S., Christodoulou, P. N., Thomas-Tsagli, E. A., Davaris, P. S. (2001):** Detection of apoptotic cells in archival tissue from diffuse astrocytomas using a monoclonal antibody to single-stranded DNA. *J Pathol* 2001, 193; 377-382

**Krammer, P. H. (2000):** CD 95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000 Vol 407; 789-795

**Laporte, M., Galand, P., Fokan, D., de Graef, C., Heenen, M. (2000):** Apoptosis in established and healing psoriasis. *Dermatology*, 2000, 200; 314-316

**Lauter, H. (1994):** Nickelallergie und Nickelkontaktekzeme. *Allergologie*, 1994, Jahrgang 17, Nr. 10/1994; 470-476

**Leonhardt, H. (1990):** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage 1990, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

**Lim, Y.-C., Henault, L., Wagers, A. J., Kansas, G. S., Luscinikas, F. W., Lichtman, A. H. (1999):** Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J Immunol*, 1999, 162; 3193-3201

**Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, D. (1989):** CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 1989, Vol 391; 344-345

**Loos van der, C. M. (1999):** Immunenzymatische Doppelfärbungen. Eine praktische Anleitung. DAKO Diagnostika GmbH

**Mack, M., Kleinschmidt, A., Brühl, H., Klier, C., Nelson, P. J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V., Schlöndorff, D. (2000):** Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Med*, 2000, Vol 6.; 769-775

**Majno, G., Joris, I. (1995):** Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995, Vol. 146 (1), 3-15

**Manome, H., Aiba, S., Tagami, H. (1999):** Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology*, 1999, Vol 98 (4); 481-489

**Mason, D. Y., Sammons, R. (1978):** Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol*, 1978, Vol 31, 454-460

**Matsue, H., Kobayashi, H., Hosokawa, T., Akitaya, T., Ohkawara, A. (1995):** Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN $\gamma$ -treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 1995, 287; 315-320

**Menné, T., Brandrup, F., Thestrup-Pedersen, K., Veien, N. K., Andersen, J. R., Yding, F., Valeur, G. (1987):** Patch test reactivity to nickel alloys. *Contact Dermatitis*, 1987, 16; 255-259

**Morales J., Homey, B., Vicari, A. P. et al. (1999) :** CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96; 14470-14475

**Mosmann, T. R., Coffman R. L. (1987):** Two types of mouse helper T-cell clone. Immunology Today, 1987, Vol. 8, No 7 and 8; 223-227

**Müller, G., Saloga, J., Germann, T., Bellinghausen, I., Mohamadzadeh, M., Knop, J., Enk, A.H. (1994):** Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. J Clin Invest, 1994, 94; 1799-1805

**Nasemann, T., Jänner, M., Schütte, B. (1982):** Histopathologie der Hautkrankheiten. 1. Auflage, 1982, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

**Nestle, F. O., Speidel, H., Speidel, M. O. (2001):** High nickel release from 1- and 2-euro coins. Nature, 2002, 419; 132

**Newton, K., Strasser, A.:** Cell death control in lymphocytes. Adv in Immunol. 2000, 76; 179-211

**Nielsen, N., Menné, T. (1992):** Allergic contact sensitization in an unselected Danish population. The Glostrup Allergy Study, Denmark. Acta Derm Venerol 1992, 72; 456-460

**Norris, D. A., Middleton, M. H., Whang, K., Schleicher, M., McGovern, T., Bennion, S. D., David-Bajar, K., Davis, D., Duke, R. C.(1997):** Human keratinocytes maintain reversible anti-apoptotic defenses in vivo and in vitro. Apoptosis, 1997, 2; 136-148

**Novak, N., Haberstk, J., Geiger, E., Bieber, T. (1999):** Dendritic cells in allergy. Allergy, 1999, 54; 792-803

**Novak, N., Allam, J.P., Betten, H., Haberstk, J, Bieber, T. (2004):** The role of antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate and they slow down in allergy. Allergy, 2004, 59; 5-14

**Ødum, N., Bregenholt, S., Eriksen, K. W., Skov, S., Ryder, L. P., Bendtzen, K., Van Neerven, R. J. J., Svejgaard, A., Garred, P. (1999):** The CC-Chemonkine

receptor 5 (CCR5) is a marker of, but not essentiell for the development of human Th1 cells. *Tissue Antigens*, 1999, 54; 572-577

**Oethinger, M. (1997):** Mikrobiologie und Immunologie. 9. Auflage, 1997, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm

**Picker L. J., Kishimoto, T. K., Smith, C. W., Warnock, R. A., Butcher, E. C. (1991):** ELAM-1 is an adhesion molecule for skin homing T cells. *Nature*, 1991, 349; 796-799

**Prinz, J. C. (2004):** Disease mimicry – a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry. *Autoimmun Rev*, 2004, 3; 10-15

**Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (1998):** 258. Auflage, 1998, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York

**Reed, J. C. (1994):** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 1994, 124 (1+2); 1-6

**Renz, H., Becker, W. M., Bufe, A., Kleine-Tebbe, J., Raulf-Heimsoth. M., Saloga, J., Werfel, T., Worm, M. (2002):** In-vitro-Allergiediagnostik. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI). *Allergo J*, 2002, 11; 492-506

**Riede, U-N.(1998):** Taschenatlas der Allgemeinen Pathologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998

**Ring, J. (1991):** Angewandte Allergologie. 2. Auflage, 1991, MMV Medizin Verlag München

**Roche Lexikon Medizin 1999**, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München

**Romagnani, S. (1991):** Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunology Today*, 1991, Vol 12 (8); 256-257

**Rowe, A., Bunker, C. B. (1998):** Interleukin-4 and the Interleukin-4 receptor in allergic contact dermatitis. *Contact dermatitis* 1998, 38; 36-39

**Rycroft, R. J. G., Menné, T., Frosch, P. J., Lepoittevin, J.-P. (1995) :** Textbook of contact dermatitis. 3.Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Schäfer, T., Böhler, E., Ruhdorfer, S., Weigel, L., Wessner, D., Filipiak, B., Wichmann, H. E., Ring, J. (2001):** Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy*, 2001, 56; 1192-1196

**Schlaak, J. F., Buslau, M., Jochum, W., Hermann, E., Girndt, M., Gallati, H., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Fleischer, B. (1994):** T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol*, 1994, 102; 145-149

**Schnuch, A., Uter, W. (2003):** Decrease in nickel allergy in Germany and regulatory interventions. *Contact Derm*, 2003, 49 (2); 107-108

**Schnuch, A., Aberer, W., Agathos, M., Brasch, J., Frosch, P. J., Fuchs, T., Richter, G. (2002):** Durchführung des Epikutantests mit Kontaktallergenen. Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI): *Allergo J* 2002, 11 242-245

**Scholzen, T., Gerdes, J. (2000):** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000, 182; 311-322

**Schröder, J. M., Harder, J. (1999):** Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31; 645-651

**Sharma, K., Wang, R. X., Zhang, L. Y., Yin, D. L., Lou, X. Y., Solomon, J. C., Jiang, R. F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D. W., Shi, Y. F. (2000):** Death, the

Fas way: regulation and the pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 88; 333-347

**Simonetti, O., Lucarini, G., Bernardini, M. L., Simoncini, C., Biagini, G., Offidani, A. (2004):** Expression of vascular endothelial growth factor, apoptosis inhibitors (survivin and p16) and CCL27 in alopecia areata before and after diphencyprone treatment: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*, 2004, 150; 940-948

**Singer, K. H., Tuck, D. T., Sampson, H. A., Hall, R. P. (1989):** Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol*, 1989, 92; 746-750

**Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., Nagata, S. (1995):** Expression of the Fas Ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*, 1995, 154; 3806-3813

**Thomas, P., Holz, T., Rueff, F., Barnstorf, S., Werfel, T., Przybilla, B. (1999):** Nickel-allergic patients with or without skin reactions upon oral nickel challenge: lymphocyte reactivity and cytokine pattern (Abstract). *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 102; 85

**Thomas, P. (2001):** *Dermatologie und Allergologie* in Böse-O'Reilly, Kammerer, Mersch-Sundermann, Wilhelm: Leitfaden Umweltmedizin, 2. Auflage, 2001, Urban und Fischer Verlag, München Jena

**Thomas, P., Summer, B., Sander, C., Przybilla, B. (2001):** In vitro T Cell Reactivity in Nickel Allergy: Comparison of T Cell Clonality, Cytokine Expression and Mediator Production. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 124 (1-3); 292-295

**Traidl, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., Merk, H. F., Puddu, P., Girolomoni, G., Cavani, A. (2000):** Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol*, 2000, 165; 3058-3064

**Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H.-U., Graeve, T., Noll, M., Bröcker, E.-B., Blaser, K., Akdis, C. A. (2000):** T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*, 2000, 106; 25-35

**Trautmann, A., Altnauer, F., Akdis, M., Simon, H.-U., Disch, R., Bröcker, E.-B., Blaser, K., Akdis, C. A. (2001):** The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol*, 2001, 117; 927-934

**Tsicopoulos, A., Qutayba, H., Varney, V., Ying, S., Moqbel, R., Durham, S. R., Kay, A. B. (1992):** Preferential messenger RNA expression of Th1- type cells (IFN- $\gamma$ +, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol*, 1992, 148 (7); 2058-2061

**Tsujimura, K., Takahashi, T., Iwase, S., Matsudaira, Y., Kaneko, Y., Yagita, H., Obata, Y (1998):** Two types of anti- TL (thymus leukemia) CTL clones with distinct target specificities: Differences in cytotoxic mechanisms and accessory molecule requirements. *J Immunol*, 1998, 160; 5253-5261

**Valyi-Nagy, I., Jensen, P. J., Albelda, S. M., Rodeck, U. (1992):** Cytokine- induced expression of transforming growth factor- $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J Invest Dermatol*, 1992, 99; 350-356

**Veien, N. K., Hattel, T., Laurberg, G. (1994):** Chromate-allergic patients challenged orally with potassium dichromate. *Contact Derm* 1994, 31 (3); 137-139

**Vestweber, D., Ebnet, K. (2001):** Leukozyteneinwanderung in entzündete Gewebe. *Biologen heute*, 2001, 1; 1-6

**Virchow jr., J. C., Abd-el-Ghani, S., Lüttmann, W. (2000):** Die Perforin- und Granzyme-B-vermittelte Apoptose. *Allergologie*, 2001, 24 (3); 121-128

**Walczak, H., Krammer, P. H. (2000):** The CD 95 (APO-1/Fas) and the TRAIL ( APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res*, 2000, 256; 58-66

**Weber-Mani, U., Pichler,, W.J. (2003):** Der Lymphozytentransformationstest (LTT) in der Diagnostik von Medikamentenallergien. *Schweiz Med Forum*, 2003, 15; 357-361

**Weedon, D., Searle, J., Kerr, J. F. R., (1979):** Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *The American Journal of Dermatopathology*, 1979, 1(2); 133-144

**Weimann, A., Engel, I. (1999):** GK 2 Allgemeine Pathologie. 13. Auflage, 1999, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

**Werfel, T., Hentschel, M., Kapp, A., Renz, H. (1997):** Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V  $\beta$  repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *J Immunol*, 1997, 158; 2500-2505

**White, C. R. jr. (1990):** Histopathology of exogenous and systemic contact eczema. *Sem in Dermatol*, 1990, 9; 3; 226-229

**Wrone-Smith, T., Mitra, R. S., Thompson, C. B., Jasty, R., Castle, V. P., Nickoloff, B. J. (1997):** Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol*, 1997, Vol 151 (5); 1321-1329

**Wyllie, A. H. (1997):** Apoptosis: An overview. *Br Med Bull*, 1997, 53 (3), 451-465

**Xu, H., Di Iulio, N. A., Fairchild, R. L. (1996):** T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: Interferon  $\gamma$ -producing (Tc1) effector CD8<sup>+</sup> T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, 1996, 183; 1001-1012

**Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Adachi, Y. S., Okabe, Y., Itazawa, T., Toyoda, M., Seki, T., Morohashi, M., Matsushima, K., Miyawaki, T. (2000):** Differential expression of the chemokine receptors, by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, 2000, 68; 568-574

**Yawalkar, N., Hunger, R. E., Buri, C., Schmid, S., Egli, F., Brand, C. u., Mueller, C., Pichler, W. J., Braathen, L. R. (2001):** A comparative study of the expression of cytotoxic proteins in allergic contact dermatitis and psoriasis; *Am J Pathol*, 2001, 158; 803-808

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig danke ich für die Erlaubnis, meine Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. P. Thomas für die Bereitstellung des Themas und die außergewöhnlich gute Betreuung.

Für die Unterstützung aus der Allergie-Abteilung möchte ich mich speziell bei Herrn Prof. Dr. med. B. Przybilla und Frau Dr. med. F. Ruëff bedanken.

Mein herzlichster Dank geht an die Mitarbeiter des Allergologie-Forschungslabors, Frau S. Maier und Herrn B. Summer für die hervorragende Einarbeitung in die Methodik und die unermüdliche Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Frau B. Mack aus der HNO-Forschung im Klinikum Großhadern München möchte ich sehr für die ausführliche Hilfestellung bei der Erarbeitung neuer und Verbesserung bestehender diagnostischer Methoden danken.

Herrn Dr. Strobl vom IBE im Klinikum Großhadern München danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Auswertung und grafischen Darstellung der Arbeit.

Im weiteren gilt mein großer Dank den Patientinnen und Patienten, welche sich zur Spende der für diese Arbeit benötigten Hautbiopsien bereiterklärten.

Weiterhin möchte ich meiner Frau Nicola für die moralische Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts danken.

## 9. Lebenslauf

Name: Hackenberg  
 Vorname: Stephan  
 Geburtsdatum: 14.08.1977  
 Geburtsort: Aachen

Eltern: Vater Dr. Ulrich Hackenberg, Diplom-Ingenieur  
 Mutter Thresia Hackenberg, geb. Panakkaparambil, Hausfrau

Schulausbildung: 1983-1885: Grundschule Saarstraße, Aachen  
 1985-1987: Grundschule der Volksschule Wettstetten  
 1987-1996: Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt

Zivildienst: 1996-1997 im psychiatrischen Langzeitbereich des  
 Krankenhauszweckverbandes Ingolstadt

Studium: WS 1997/98: Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-  
 Maximilians-Universität München  
 SS 1999: Ärztliche Vorprüfung  
 SS 2000: Erstes Staatsexamen  
 Dezember 2000: Beginn der Dissertation  
 WS 2003: Zweites Staatsexamen  
 SS 2003/ WS 2003/04: Praktisches Jahr  
 WS 2003/04: Drittes Staatsexamen

Berufstätigkeit: seit November 2004 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der  
 HNO-Klinik des Universitätsklinikums Regensburg

Persönliche  
 Verhältnisse: 2002: Heirat mit Nicola Feil  
 2003: Geburt des Sohnes David  
 zur Zeit wohnhaft in 81369 München, Klingerstraße 31