Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. komm. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig
jetziger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Ruzicka

In-vitro-Charakteristika der Nickel-Kontaktallergie unter Einbeziehen der periimplantären Immunreaktion bei Hüftimplantatträgern

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

vorgelegt von
Burkhard Summer

aus
München

Jahr
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Peter Thomas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Elsenhans Priv. Doz. Dr. Gerald Messer Prof. Dr. Dr. Wolfgang Plitz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Peter Thomas
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.11.2006

1 EINLEITUNG 4

1.1 Klassifikation der allergischen Reaktionen 4

1.2 Das allergische Kontaktekzem 5

1.2.1 Morphologie 5

1.2.2 Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems 6

1.3 T-Zell Differenzierung 8

1.4 Epidemiologie des allergischen Kontaktekzems 9

1.5 Ätiologie des allergischen Kontaktekzems 10

1.6 Diagnostik bei Kontaktallergie 11

1.7 Nickel als wichtigstes Kontaktallergen 13

1.7.1 Historie 13

1.7.2 Vorkommen 13

1.7.3 Klinisches Bild des Nickel-Kontaktekzems 13

1.8 Sonderfall Metallimplantate 14

1.8.1 Klinische Erscheinungsbilder bei Metallimplantatallergie 14

2 ZIELE DER ARBEIT 16

3 MATERIAL UND METHODEN 17

3.1 Materialien 17

3.1.1 Reagenzien 17

3.1.2 Geräte 19

3.1.3 Verbrauchsmaterialien 20

3.1.4 Puffer und Lösungen 20

3.2 Blutspender und Gewebeherkunft 22

3.3 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus dem peripheren Blut 23

3.4 Trypanblaufärbung (Toxizitätsbestimmung) 24

3.5 Apoptosebestimmung 24

3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT) 25

3.7 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen 26

3.8 Durchflusszytometrie 28
3.8.1 Oberflächenfärbung 28
3.8.2 Intracytoplasmatische Färbung 28

3.9 ELISA 29

3.10 DNA-Isolierung 30

3.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 32

3.12 RNA-Isolierung 35

3.13 Reverse Transkription 37

3.14 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 38

3.15 Analyse der Genexpression 39

3.16 Quantitative RT-PCR 40

3.17 Datenauswertung und Statisitik 44

4 ERGEBNISSE 46

4.1 Toxizitätsbestimmung verschiedener Metalle 46
4.1.1 Trypanblau-Exklusion 46
4.1.2 Annexin V-Färbung 50

4.2 Apoptoseschwelle nach Nickel-Stimulation 52

4.3 Reifung dendritischer Zellen (DZ) nach Nickelkontakt 56

4.4 Einfluss von 1% und 10% AB-Serum auf Zellkulturparameter 58
4.4.1 Einfluss von 1% und 10% AB-Serum im Kulturmedium auf die Zellproliferation 58
4.4.2 Zusammenfassender Vergleich der Proliferation unter Zusatz von 1% und 10% AB-Serum 61
4.4.3 IFNγ-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium 65
4.4.4 IL4-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium 66
4.4.5 IL12p70-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium 67

4.5 Oligoklonalität in PBMC Nickel-allergischer Blutspender nach In-vitro-Stimulation 68

4.6 Kinetik der T-Zellreaktion in vitro 74
4.6.1 Klonalitätsanalyse 78
4.6.2 IL-4 und IFNγ-Expression in vitro (RT-PCR) 81

4.7 Analyse der PBMC nach In-vitro-Stimulation mittels Durchflusszytometrie 84

4.8 Gewebeuntersuchungen 86
4.8.1 Oligoklonalität in Biopsien aus Nickel-Epikutantestreaktionen Nickel-allergischer Personen 86
4.8.2 RT-PCR aus periimplantärem Gewebe 91
4.8.3 Erweiterte Zytokinexpression im periimplantären Gewebe 95

5 DISKUSSION 98

5.1 Toxizitätsbestimmung verschiedener Metalle 98

5.2 Apoptoseschwelle nach Nickel-Stimulation 102

5.3 Reifung dendritischer Zellen nach Nickelkontakt 105

5.4 Einfluß von 1% und 10% AB-Serum auf Zellkulturparameter und die Kinetik der T-Zellreaktion in vitro 106

5.5 Oligoklonalität in PBMC Nickel-allergischer Blutspender nach In-vitro-Stimulation 109

5.6 Analyse der PBMC nach Stimulation in vitro mittels Durchflusszytometrie 111

5.7 Gewebeuntersuchungen 113
5.7.1 Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen 113
5.7.2 Periimplantäres Gewebe 114

6 ZUSAMMENFASSUNG 119

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 121

8 DANKSAGUNG 123

9 LITERATURVERZEICHNIS 124

10 LEBENSLAUF 133

1 Einleitung

1.1 Klassifikation der allergischen Reaktionen

1906 wurde durch Clemens von Pirquet der Begriff „Allergie“ eingeführt [137]. Dieser Terminus sollte als Oberbegriff für eine Vielzahl von klinischen Beobachtungen dienen, bei denen veränderte, überschießende Reaktionen gegen an sich harmlose Stoffe des Lebensumfeldes vorkamen. In der Folgezeit wiesen Prausnitz und Küster 1921 anhand ihres Serumübertragungsversuches („passive kutane Anaphylaxie“) darauf hin, daß spezifische Faktoren im Blut der jeweils überschießend reagierenden Personen vorliegen müssten [94]. In den 60er Jahren wurden diese als Reagine bezeichneten Faktoren als Immunglobulin E identifiziert [63,64]. Natürlich wurde auch erkannt, daß aufgrund der vom Verlauf und Ausprägung sehr unterschiedlichen Überempfindlichkeitsreaktionen verschiedene Mechanismen vorhanden sein müssten. Coombs und Gell haben hier ein mit Einschränkungen noch heute oft zitiertes Denkmodell geliefert [34]. Dabei stellt die Klassifikation eine Unterteilung nach den hauptsächlich beteiligten Effektormechanismen dar. Die ersten drei werden durch Antikörper vermittelt, der vierte Typ über Zellen (T-Zellen und Makrophagen):

- **Typ I:** Anaphylaktische Reaktionen. Diese Reaktionen werden durch IgE-Antikörper vermittelt, die an die hochaffinen IgE-Rezeptoren auf basophilen Granulozyten und Mastzellen binden. Die Bindung des entsprechenden Antigens führt dann zu einer Quervernetzung benachbarter IgE-Moleküle, was zu einer Degranulation mit Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren führt. Die Überempfindlichkeitsreaktion tritt dann sehr rasch auf. Klinische Bespiele dafür sind neben dem anaphylaktischen Schock bestimmte Formen von Urtikaria und Angioödem sowie die allergische Rhino-Konjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale.
- **Typ II:** Zytotoxische Reaktionen. Diese Reaktion wird durch Antikörper vermittelt, die an Zellen binden. Anschließend erfolgt eine Aktivierung von Komplement und es kommt bei völligem Ablauf der Komplementkaskade zur Lyse der Zellen. Aktivierte Komplementfragmente rekrutieren auch andere Effektorzellen oder es binden Zellen (v.a. NK-Zellen und aktivierte Makrophagen) mit Fc-Rezeptoren an die Fc-Stücke der Antikörper und führen so über die Ausschüttung toxischer Substanzen zur Zytotoxizität. Diese Reaktionen sind beispielsweise bei Autoimmunkrankheiten (wie

der hämolytischen Anämie), bei der Transfusionsreaktion und bei gewissen Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Medikamente im Spiel.

- **Typ III:** Immunkomplex-mediierte Reaktionen. Der Gewebeschaden wird hierbei durch Antigen-Antikörperkomplexe verursacht, die sich bevorzugt an Basalmembranen von Gefäßen ablagern und durch Komplementaktivierung zu Entzündung und Gewebezerstörung führen. Bespiele hierfür sind die nekrotisierende Vaskulitis und die Serumkrankheit.
- **Typ IV:** Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ. Dieser Reaktionstyp ist durch eine lymphozytäre Infiltration (T-Zellen) charakterisiert. Klassische Beispiele dieser Reaktion sind z.B. die Tuberkulinreaktion und das allergische Kontaktekzem mit dem sich diese Arbeit beschäftigt. Auch die Graft-vs-Host-Reaktion sowie die Transplantatabstoßung wurden in diesem Reaktionstyp zusammengefasst [21].

1.2 Das allergische Kontaktekzem

Das klassische Beispiel für die Typ IV-Reaktion bzw. für die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ ist das allergische Kontaktekzem. Die Überempfindlichkeit besteht dabei gegen (meist) exogen auf die Haut auftreffende Substanzen („Kontaktallergene“). Bei episodischer Exposition bildet sich ein akutes, bei wiederholter oder dauernder Exposition ein chronisches allergisches Kontaktekzem aus. Das allergische Kontaktekzem setzt im Gegensatz zum toxischen Kontaktekzem eine spezifische lymphozytäre Sensibilisierung voraus, es tritt also nur bei einem Teil der Exponierten auf. Die Intensität des Erscheinungsbildes hängt vom Grad der Sensibilisierung und/oder der Stärke der Exposition ab. Im Unterschied zum toxischen Kontaktekzem neigt das allergische Kontaktekzem zur Ausbildung von Streuherden.

1.2.1 Morphologie

Das akute Kontaktekzem ist zunächst auf den Ort der Einwirkung begrenzt und beinhaltet ein Erythem mit intraepidermalem Ödem. Im einfachsten Fall erfolgt in diesem Stadium nach einigen Tagen die Abheilung mit Abschuppung. Ist die Reaktion heftiger, kommt es zu spongiotischen Bläschen (Spongiose = interzelluläres Ödem zwischen den Keratinozyten der Epidermis), die mit klarer Flüssigkeit gefüllt

sind und jucken. Das chronische Stadium der Ekzemreaktion entsteht, wenn die Noxe wiederholt oder kontinuierlich einwirkt und deshalb die spontane Abheilung ausbleibt. Es kommen dann sämtliche Morphen (Erythem, Bläschen, Krusten, Schuppen) nebeneinander vor und die Begrenzung des Ekzems wird unscharf [21]. Die Haut ist durch die entzündliche Infiltration voluminöser und es kommt zur Lichenifikation. Histologisch erkennt man im chronischen Stadium eine akanthotische Reaktion der Epidermis mit wechselnder Hyper- und Parakeratose (= vermehrte Proliferation der Epidermis und damit einhergehende zunehmende Verhornung) und fleckiger lymphozytärer Infiltration der Dermis. Die Spongiose und spongiotische Bläschen treten in den Hintergrund [40]. Im akuten Stadium besteht das entzündliche Infiltrat in Dermis und Epidermis aus T-Helfer-Lymphozyten (v.a. CD4+), Monozyten und vereinzelt teils eosinophilen Granulozyten [101].

1.2.2 Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems

Bei dem allergischen Kontaktekzem (AKE) unterscheidet man eine Sensibilisierungs- und eine Auslösephase. In der Sensibilisierungsphase baut sich eine spezifische Immunantwort gegen potentielle Kontaktallergene auf. Bei erneutem oder wiederholtem Kontakt führt die in Gang gesetzte Immunreaktion („Auslösephase“) zu einer allergischen Entzündung mit dem klinischen Bild eines akuten oder chronischen allergischen Kontaktekzems [101].

Sensibilisierungsphase

Beim Erstkontakt mit dem Hapten (kleines Molekül, das nur durch Bindung an ein Trägerprotein zu einem immunogen wirkenden Antigen wird) wird der Hapten-Proteinkomplex durch epidermale (Langerhans-Zellen) oder dermale dendritische Zellen aufgenommen, prozessiert und letztendlich über den MHC (major histocompatibility)-Komplex präsentiert. Die Sensibilisierung ist an entzündliche Vorgänge gebunden, da sie eine Aktivierung der dendritischen Zellen in Folge der Freisetzung bestimmter Zytokine (IL-1, GM-CSF) benötigt. Diese wandern anschließend über die afferente Lymphe in die regionalen Lymphknoten und präsentieren dort das haptenisierte Peptid an naive T-Zellen mit passendem T-Zell-Rezeptor (TZR). Durch deren Aktivierung (Blastentransformation) und Proliferation entstehen allergenspezifische Th1 (CD4+)- und zytotoxische (CD8+) Zellklone, die mit dem Blut zirkulieren und sich kraft ihrer Adhäsionsmoleküle präferentiell in der

Haut bzw. an dem Ort der Sensibilisierung anreichern. Bei Substanzen mit hohem Sensibilisierungspotential (z.B. „poison ivy“, d.h. den Inhaltsstoffen der Giftefeu-Pflanze) beträgt die minimale Zeitspanne bis zum Abschluß der Sensibilisierung 5 Tage, andere Substanzen (z.B. Chromat) führen dagegen erst nach monate- oder jahrelangem Kontakt zu einer Sensibilisierung. Diese persistiert über Jahre.

Auslösephase

Hat eine sensibilisierte Person wieder Kontakt mit dem Hapten, so kommt es nach üblicherweise 12-48 Stunden zum Auftreten der akuten Ekzemreaktion. Diese wird durch antigenspezifische Th1-Memory-Zellen vermittelt, die im Bereich der Reexposition ins Gewebe austreten und dort durch Antigenpräsentation (dendritische Zellen, Makrophagen) zur Proliferation und Zytokinausschüttung (IL-1, IL-2, IFN-γ) stimuliert werden und die Generation antigenspezifischer zytotoxischer Zellen amplifizieren (Abb.1). Es bildet sich eine gegenseitige Verstärkung entzündungsfördernder Funktionszustände durch alle beteiligten Zelltypen, deren Ziel die Attacke gegen allergentragende epidermale Zielstrukturen ist:

- Aufregulierung der Klasse-II-Antigene an Langerhanszellen und damit die Verstärkung der Antigenpräsentation (IFN-γ vermittelt)
- autokrine Stimulation der T-Zellen durch IL-2
- Verstärkung der Zytokinproduktion aller beteiligten Zellen durch IFN-γ (verstärkte Produktion von IL-1, TNF-α, IL-6, IL-3, GM-CSF)
- Makrophagenaktivierung durch IFN-γ
- Induktion verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokine an Endothel- bzw. Entzündungszellen durch die freigesetzten Zytokine und damit Attraktion weiterer T-Zellen, aber auch neutrophiler und basophiler Granulozyten
- Freisetzung vasoaktiver Amine aus Mastzellen
- Das Resultat aller dieser Vorgänge sind Spongiose, Blasenbildung und letztendlich die Ausschaltung der auslösenden Noxe, d.h. der allergentragenden Keratinozyten, über zytotoxische Zellen.

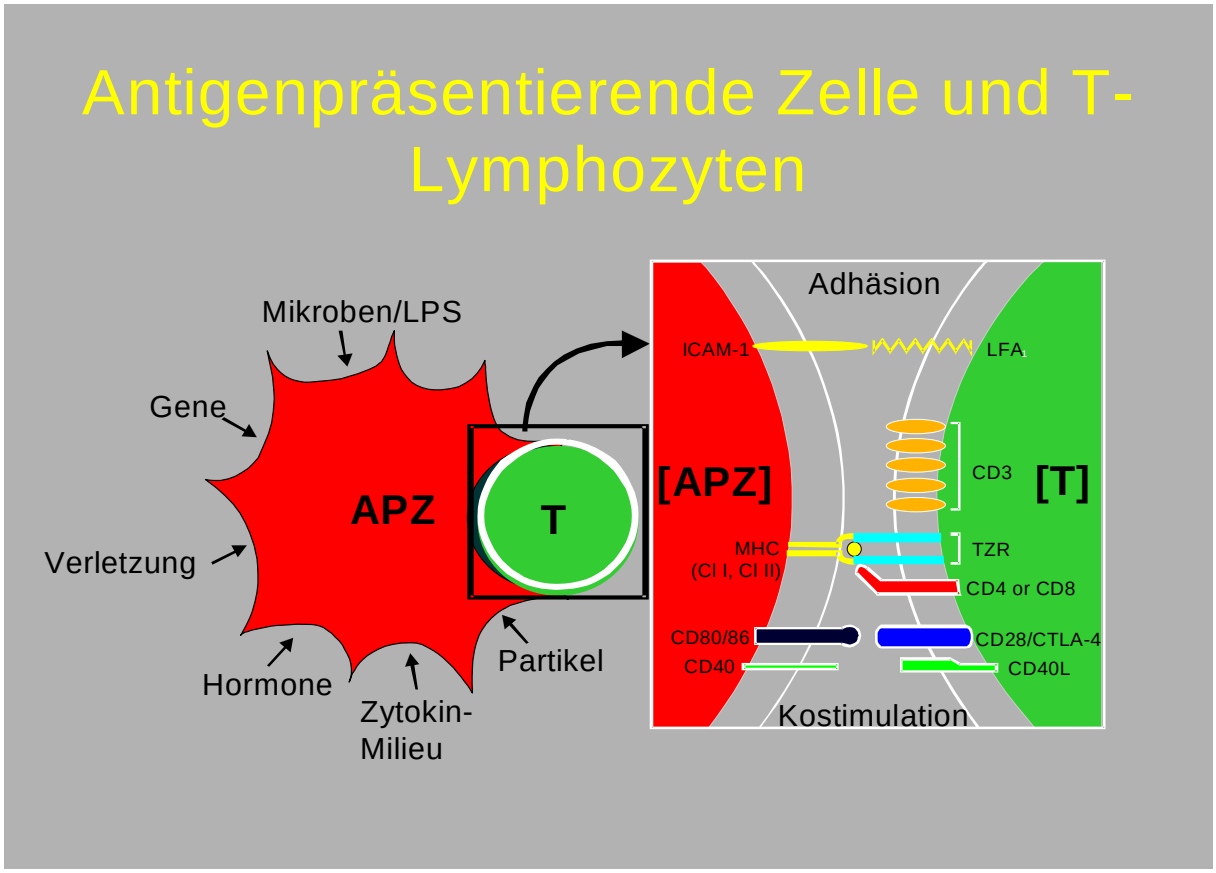


Abb. 1: Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle (APZ) und T-Zelle bei der T-Zell-Aktivierung (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

Regression

Die Mechanismen der spontanen Regression der akuten allergischen Ekzemreaktion (bei einmaliger Exposition nach ca. 48-72h) sind nur zum Teil bekannt. Wichtig ist dabei die Elimination von „Nicht-Selbst“ (d.h. den haptenisierten Epidermalzellen) und die Wirkung regulierender T-Zellen. Zusätzlich wird IL-10 von Keratinozyten produziert und dämpft die Immunantwort durch Hemmung der Antigenpräsentation und Zytokinproduktion. Schließlich bewirken die unter IFN-γ-Exposition Klasse-II-exprimierenden Keratinozyten mangels B7-kostimulatorischer Moleküle eine Anergie der Th1-Zellen [101].

1.3 T-Zell Differenzierung

Während der Sensibilisierungsphase produzieren allergenspezifische aktivierte T-Zellen innerhalb von 30 Minuten nach der Stimulation IL-2. Dadurch beginnen spezifisch stimulierte T-Zellen schnell zu proliferieren [48]. Während die Allergenspezifität während der Proliferation erhalten bleibt, differenzieren sich die

entstehenden T-Zellen innerhalb weniger Tage in Effektorzellen mit klar getrennten Zytokinprofilen [100].

- Typ 0: IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-β
- Typ 1 : v.a. IFN-γ, TNF-β
- Typ 2: IL-4 und/oder IL-10
- Typ 3: TGF-β

Zellen vom Typ 1 fördern Entzündung und zytotoxische Effektor-Zellfunktionen, das Typ 2-Zytokinprofil fördert die Antikörperproduktion und die Typ 3-Zellen unterstützen letztendlich anti-inflammatorische Aktivitäten in Verbindung mit der IgA-Produktion.
CD4+ und CD8+ allergenspezifische T-Zellen sind an der Sensibilisierung beteiligt und beide Untergruppen können diese polarisierten Zytokinprofile ausbilden, so daß beide Gruppen getrennte Effektor und regulatorische Rollen beim AKE spielen [28]. Einflussfaktoren auf die Polarisierung der Zytokinproduktion sind:

- der Ort und das Zytokinmilieu beim ersten Allergenkontakt
- die molekulare Struktur und die Konzentration des Allergens
- neuroendokrine Faktoren

Der primäre Hautkontakt mit den meisten Kontaktallergenen führt bei gesunden Personen zur Differenzierung und Expansion von allergenspezifischen Effektor T-Zellen vom Typ 1. Werden die gleichen Allergene an Schleimhautoberflächen aufgenommen, wird eine Entwicklung von Typ 2 und/oder Typ 3 Effektor T-Zellen begünstigt. Ein lang andauernder Allergenkontakt (auch über die Haut) führt letztendlich bei fast allen Allergenen zu einer Dominanz allergen-spezifischer T-Zellen vom Typ 2, die die Rolle der Typ 1-Zellen übernehmen und so die Kontaktallergie verursachen.

1.4 Epidemiologie des allergischen Kontaktekzems

Das akute oder chronisch allergische Kontaktekzem macht in einer Hautklinik ca. 5-10% aller Dermatosen aus. Die Prävalenz des Kontaktekzems liegt in der allgemeinen Bevölkerung bei 2-9% und ist in industrialisierten Staaten höher als in Agrarländern. Neben dem Beruf kommen relevante Allergenexpositionen in allen Bereichen des täglichen Lebens vor (Haushalt, Hobby, Freizeitgestaltung, Körperpflege und Kosmetik u.a.), wobei Berufsekzeme häufig eine Kombination von allergischem und kumulativ-toxischem Kontaktekzem darstellen. Für die Auslösung kumulativ-toxischer Reaktionen ist häufig eine atopische Veranlagung von

Bedeutung. Handekzeme sind bei Frauen im allgemeinen häufiger, es besteht beim allergischen Kontaktekzem aber keine grundsätzliche geschlechtsspezifische Disposition. Allergische Kontaktekzeme können im Prinzip an allen Körperstellen lokalisiert sein, wobei sich im allgemeinen das allergische Kontaktekzem an der Einwirkstelle des Kontaktallergens entwickelt. Die häufigsten Allergengruppen für alle Lokalisationen sind Duftstoffe, Salbengrundlagen und Konservierungsstoffe [21], wobei auch die Gruppe der Metalle mit Nickel als dem häufigsten Kontaktallergen eine sehr wichtige Rolle spielt [106]. Nach Literaturangaben liegt die Prävalenz von Metallallergien im Durchschnitt ca. bei 10% und ist z.B. in Schweden mit ca. 21% höher als in Japan mit 5.6% [148]. Sie ist im allgemeinen bei Frauen höher als bei Männern [108]. Am häufigsten werden Allergien gegenüber Nickel (hauptsächlich bei Frauen wegen des Tragens von Modeschmuck [107,108] und gegenüber Chromat (klassischerweise bei Männern wegen des Arbeitens mit Zement [101]) beobachtet.

1.5 Ätiologie des allergischen Kontaktekzems

Es sind ca. 3000 Kontaktallergene bekannt, von denen nur ein kleiner Teil in der normalen Umwelt vorkommt (z.B. pflanzliche Substanzen). Meist handelt es sich um elektrophile niedermolekulare Substanzen (MG 500-1000Da). Sie werden auch als Haptene bezeichnet, da sie eine kovalente Bindung an ein Trägerprotein benötigen um als Vollantigen eine Sensibilisierung auslösen zu können. Als Trägerproteine dienen meist Serumalbumin, epidermale Proteine, aber auch in den MHC-Gruben befindliche präformierte Peptide.

Tabelle 1 zeigt die Liste der häufigsten Kontaktallergene aus den Daten des Informationsverbandes Dermatologischer Kliniken (IVDK) des Jahres 2001:

Substanz	Getestet (n)	Positiv (n)	Positiv (%)
Nickel(II)-sulfat	8391	1164	15,9
Duftstoff-Mix	8414	874	9,8
Perubalsam	8433	867	9,1
Kobalt(II)-chlorid	8430	447	5,8
Kaliumdichromat	8446	398	4,5
Kolophonium	8427	390	4,4
Wollwachsalkohole	8437	390	4,2
Methyldibromoglutaronitrile/ Phenoxyethanol	8098	349	4,0
p-Phenylendiamin	8426	341	4,0
Kompositen-Mix	8059	311	3,7
Thiuram-Mix	8426	226	2,6
Quecksilberamid-Chlorid	8468	196	2,5

Tabelle 1: Aktuelle Sensibilisierungsquoten der 12 häufigsten Allergene im Gesamtkollektiv des Informationsverbundes dermatologischer Kliniken (IVDK) im Jahre 2001 [106]

Ende der 80er Jahre zeigten Studien den Anstieg der Nickelallergie v.a. bei jungen Mädchen. Dies beruhte v.a. auf Modetrends wie durchstochenen Ohrläppchen oder später auch das Piercing. Mit der Einführung der „Nickel Directive“ in der Europäischen Union [1] schien über eine Begrenzung der Nickelfreisetzung aus Gebrauchsgegenständen sowie Modeschmuck die Zahl der Nickel-Neusensibilisierungen rückläufig (Begrenzung der Nickelfreisetzung auf 0.5µg/cm²/Woche) [107]. Chromatsensibilisierungen scheinen abzunehmen, da in den letzten Jahren Chromat-arme Zemente auf den Markt gekommen sind [131]. Dagegen lässt sich ein Anstieg der Duftstoff- und Terpentinölallergie mit dem steigenden Einsatz bzw. Konsum von Duftstoffen und („alternativen“) ätherischen Ölen erklären [106]. Der genetische Aspekt der Kontaktsensibilisierungen ist im Gegensatz zu den IgE-vermittelten Sensibilisierungen noch unklar. Patienten mit moderater bis schwerer atopischer Dermatitis in der Kindheit scheinen ein höheres Risiko bezüglich des Auftretens von Ekzemen zu haben (60% bzw. 48%), ebenso solche mit Atemwegsallergien (14%) im Vergleich zu Nichtatopikern (11%) [131]. Auf der anderen Seite bedarf es keiner bestimmten genetischen Disposition, eine Kontaktallergie z.B. auf Primeln oder 2,4-Dinitrochlorbenzol zu entwickeln [109,147].

1.6 Diagnostik bei Kontaktallergie

Zur klinischen Diagnostik einer Kontaktallergie wird der Epikutantest herangezogen. Hier findet sozusagen ein Provokationstest unter standardisierten Bedingungen an der Haut statt. Als In-vitro-Diagnostiksystem für eine T-zelluläre Sensibilisierung wird der Lymphozytentransformationstest (LTT) eingesetzt. Die klinische Relevanz der gefundenen Sensibilisierung muß allerdings ergänzend gezeigt werden.

Beim Epikutantest werden die zu testenden Allergene mittels Pflasterstreifen für 24-48 Stunden auf den Rücken des Patienten aufgebracht und die Reaktionen nach 24 bzw. 48 und 72 Stunden abgelesen. Bei einer Sensibilisierung gegen ein Allergen finden sich Ekzemreaktionen wie oben beschrieben. Der Epikutantest ist in der Handhabung relativ einfach. Die Interpretation einer Testreaktion erfordert jedoch bei der Unterscheidung zwischen spezifischen allergischen und unspezifischen irritativ-toxischen Reaktionen viel Erfahrung. Gelegentlich werden auch falsch-negative oder falsch positive Ergebnisse beobachtet [20]. Es wurde neben einer Verschlechterung vorbestehender Ekzeme auch das allerdings sehr seltene Risiko von Neusensibilisierungen durch den Epikutantest beschrieben [5]. Deshalb muß der

Patient testfähig sein, also beispielsweise keine aktuellen Ekzeme haben oder testbeeinflussende Medikamente einnehmen. Zusätzlich müssen standardisierte Testsubstanzen verwendet werden.

Der LTT stellt ein In-vitro Testverfahren zur Diagnostik einer T-zellulären Sensibilisierung dar, die auch bei Kontaktallergie vorliegt. In den 60er Jahren konnte zunächst mikroskopisch die Lymphozytentransformation zu großen Blasten bewertet werden. Später wurde die Proliferation der Lymphozyten mittels Einbau von Tritium-markiertem Thymidin bestimmt [27]. Während mehrtägiger Kokultur der mononukleären Blutzellen mit dem Antigen kommt es zu einer Aktivierung sensibilisierter T-Lymphozyten durch Erkennen des spezifischen Antigens in Anwesenheit von autologen Histokompatibilitäts-Antigenen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Inwiefern hieraus eine krankmachende Überempfindlichkeit entsteht, kann nicht anhand des In-vitro-Tests alleine gesagt werden.
Die erste Publikation über Nickel als untersuchtes Antigen im LTT erschien schon 1962 von Aspegren und Rorsmann [10], aber erst 1970 fanden McLeod et al. signifikante Unterschiede zwischen Nickelallergikern und Kontrollpersonen [82]. Seither finden sich widersprüchliche Angaben über die Qualität des LTT und seine Korrelation mit dem Epikutantest. Al-Tawil zeigte 1981 die Bedeutung der Konzentration des Antigens in den Testansätzen. So wirkt Nickel in Konzentrationen über 50µg/ml als schwaches Mitogen, ruft also eine unspezifische Proliferation von Lymphozyten hervor [7]. In niedrigen, aber noch eine Epikutantest-Reaktion auslösenden Konzentrationen, findet Al-Tawil nur eine schwache Korrelation (Korrelationskoeffizient 0.42-0.46) zum LTT. Andere Forschergruppen berichten dagegen übereinstimmend von einer Sensitivität des LTT für die Nickel induzierte Kontaktdermatitis von mindestens 92% bei einer Spezifität von mindestens 90% [38,43,96]. Räsänen konnte eine Korrelation zwischen Intensität der Epikutantest-Reaktion und Höhe der Stimulation im LTT in nahezu signifikanten Bereichen zeigen ($p = 0.05 - 0.1$). Aufgrund des labortechnischen Aufwandes und vielfältiger Störmöglichkeiten gilt der LTT jedoch nach wie vor eher als experimentelle Methode für die Untersuchung von Kontaktallergien.

1.7 Nickel als wichtigstes Kontaktallergen

1.7.1 Historie

Nickel wurde Mitte des 18. Jahrhunderts von dem schwedischen Mineralogen Axel Fredrik Cronstedt isoliert. Ab dem 19. Jahrhundert fand Nickel eine breite Verwendung, v.a. bei der Stahlherstellung [86]. 1889 beschrieb man die Nickel-Kontaktdermatitis als sogenannte „Nickelkrätze“, die typischerweise in der Galvanisierungsindustrie beobachtet wurde [17]. Schittenhelm und Stockinger untersuchten in Kiel 1925 diese „Nickelkrätze“ und wiesen die Nickelallergie mittels eines Epikutantestverfahrens nach, indem sie einen Läppchentest mit Nickelsulfat und Nickelammoniumsulfat durchführten [105]. Seitdem etablierte sich Nickel als eines der wichtigsten ubiquitären Kontaktallergene.

1.7.2 Vorkommen

In der Natur taucht Nickel im Boden gebunden in Form von Oxiden oder Sulfiden auf zusammen mit Kobalt, Kupfer und in geringen Mengen auch anderen Metallen (Platin, Palladium usw.). Es wird hauptsächlich in Stahl verwendet, zusammen mit Eisen und Chrom und ist damit in alltäglichen Gebrauchsgegenständen weit verbreitet. Die in der Natur zu findenden Nickelverbindungen sind nicht allergen, nur das freie Nickelion besitzt Haptencharakter.

1.7.3 Klinisches Bild des Nickel-Kontaktekzems

In der Vergangenheit tauchte das Nickel-Kontaktekzem erstmals als Hand- und Unterarm-Ekzem bei Arbeitern in der Galvanisierung auf. In den 50er und 60er Jahren wurde eine Reihe von Nickel-Dermatitis-Fällen von Calnan et al. veröffentlicht [23,24]. Die Autoren unterschieden dabei zwischen primärer Hauterscheinung („eruption“) am Ort der ursprünglichen Kontaktsensibilisierung und sekundären Hauterscheinungen. Letztere würde man heute beispielsweise als Streuherde oder generalisiertes (oft symmetrisch verteiltes) Kontaktekzem interpretieren. Die Sensibilisierungsquellen im beruflichen und privatem Umfeld haben sich im Laufe der Jahre geändert.

Einen Sonderfall stellt die systemische Kontaktdermatitis dar, bei der Patienten mit einer Spättypallergie auch nach Allergenkontakt von innen heraus Ekzeme entwickeln. Dies kann nach Medikamentengabe oder –infusion genauso entstehen wie durch Nickel-Aufnahme über die Nahrung. Eine systemische Kontaktdermatitis

kann bei Patienten auch unter standardisierten Bedingungen in Form einer (oralen) Provokationstestung – beispielsweise mit Nickel – ausgelöst werden [32].

1.8 Sonderfall Metallimplantate

In den chirurgischen Fächern werden immer mehr metallische Implantate insbesondere Osteosynthesematerialien und Endoprothesen eingesetzt. Zusätzlich werden längere Einsatzzeiten der Endoprothesen angestrebt. Damit kann auch das Problem von Implantat-assoziierten Allergien (klinisch relevante spezifische Reaktion auf ein Antigen) zunehmen. Insbesondere da viele metallische Implantate bzw Osteosynthesematerialien Bestandteile haben, die als kutane Kontaktallergene bekannt sind [83]. Inzwischen gibt es für nahezu alle Extremitätengelenke Prothesen mit unterschiedlicher Gestalt, Mechanik, Verankerungsform und Materialkombination. Die wichtigsten eingesetzten Stoffe sind dabei Kobalt-Chrom-Metallegierungen, Titan, Polyäthylen und Keramik. Implantatkomponenten können über elektrochemische Korrosion und mechanischen Abrieb freigesetzt werden [33,83]. Auch die Kombination verschiedener Metallwerkstoffe kann durch unterschiedliche Oberflächenpotentiale zu galvanischer Korrosion führen. Kobaltbasislegierungen können in Paarung mit rostfreiem Stahl zu korrosiven Angriffen an der Stahllegierung führen. Implantatnahe Abriebpartikel unterschiedlicher Größe sind mikroskopisch im periimplantären Gewebe nachweisbar, sie können sich aber auch in den regionalen Lymphknoten und in Organen anreichern [128,145]. Nickel- und Kobaltionen können relativ gut ausgeschieden werden, Chrom dagegen bleibt aufgrund zusätzlicher intrazellulärer Bindungen lange im Körper [83]. Das Ausmaß und die Dauer der ausgelösten Entzündungsantwort wird durch die Materialeigenschaften, durch Lokalisation und Gewebeeigenschaften des Implantatlagers sowie durch die immunologische Reagibilität des betroffenen Organismus bestimmt.

1.8.1 Klinische Erscheinungsbilder bei Metallimplantatallergie

Ekzeme wurden beschrieben, die bei Metallallergie an der Körperregion mit Osteosynthesematerialien, sowie über Knie- oder Hüftendoprothesen auftraten und nach Materialentfernung wieder verschwanden [26,73,89,139]. Ebenso gibt es Berichte über disseminierte Ekzeme nach der Einbringung von Metallimplantaten. Manche Patienten mit Nickel- oder Chromat-induziertem Kontaktekzem können lokalisierte oder disseminierte Ekzeme auch durch eine hämatogene Auslösung von innen

heraus entwickeln, z.B. über eine Allergenzufuhr durch Nahrungsmittel [69,132]. Bei Patienten, die auf eine hämatogene Nickelexposition mit Ekzem reagierten, wurde auch eine erhöhte Frequenz Nickel-spezifischer Lymphozyten im Blut nachgewiesen [123]. Unklar ist bisher, ob dieses Phänomen auch bei Patienten mit disseminiertem Ekzem nach Implantateinbringung und Nachweis einer Kontaktallergie gegen Implantatkomponenten auftritt.

Vereinzelt kommen auch Urtikariaschübe in Zusammenhang mit Metallimplantation vor [81]. Ebenso treten auch bei Patienten mit Nickelkontaktallergie nicht nur Rötung und Wundheilungsstörungen im Bereich von Metallklammer-Hautnähten auf, sondern es wurden auch Pseudolymphom-artige Schwellungen und „sterile“ Osteomyelitis (nach sternaler Stahldrahtcerclage) beschrieben [50,58]. Immunologisch-allergologische Reaktionen werden auch als Ursache für aseptische Endoprothesenlockerung in Betracht gezogen [49,99]. Andererseits wird oft beobachtet, daß das Einbringen von nickelhaltigen Materialien bei Patienten mit Nickelkontaktallergie nicht zwangsläufig zu sichtbaren Komplikationen führt. Entsprechende Berichte ließen allerdings den Aspekt der periimplantären Reaktion unberücksichtigt [25,41]. So wurde bei einem Teil von Patienten mit komplikationsbedingten Revisionsoperationen zwar keine kutanen Hinweise für Überempfindlichkeitsreaktionen gefunden, dafür aber periimplantäre entzündliche Infiltrate mit Charakteristika von Spättyp-Überempfindlichkeits-reaktionen [125,136].

Der Kontakt von Metallimplantaten mit Immunzellen findet nicht nur im periimplantären Gewebe oder über das Knochenmark statt, sondern kann auch speziell bei Einbringen in die Blutbahn direkt mit zirkulierenden Immunzellen geschehen. So zeigte sich bei Patienten mit Molybdän- oder Nickelallergie eine signifikant höhere Restenosierungsrate von Edelstahl-Stents. Unbekannt ist, welche Rolle der Kontaktallergie zukommt neben dem Stent-assoziierten Risiko einer direkten oder Immunglobulin-vermittelten Komplementaktivierung bzw. dem Thrombosierungsrisiko [72].

2 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Nickelkontaktallergie als der am häufigsten vorkommenden Kontaktallergie. Dabei soll untersucht werden in wie weit bestimmte In-vitro-Charakteristika bei Patienten mit Nickelkontaktallergie erkennbar sind. Zu diesem Thema wurden folgende Aspekte über In-vitro-Untersuchungen hinterfragt:

1. Wo liegt die Apoptose- und Nekroseschwelle von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) gegenüber Nickel und einigen anderen Metallen? Damit sollte festgestellt werden, bei welcher Konzentration toxische Effekte die immunologische Reagibilität der PBMC überlagern. Gibt es individuelle Unterschiede in der Reagibilität der PBMC einzelner Probanden?
2. Haben dendritische Zellen einen Einfluss auf die Ausbildung der allergischen Entzündung bei Nickelkontaktallergie und welche Faktoren spielen dabei eine Rolle?
3. Welche Aktivierungsphänomene sind bei PBMC von Nickel-allergischen und nicht-allergischen Personen unter Nickelexposition erkennbar, und zwar in Bezug auf Zytokinexpression, Phänotyp und Proliferation?
4. Gibt es Korrelationen bzw. Analogien zwischen Entzündungsvorgängen in Gewebeproben aus Nickelkontaktdermatitis-Arealen (Nickel-Epikutantestreaktionen) und in Proben aus periimplantärem Gewebe von Patienten mit Hüftendoprothesen-Revisionsoperationen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien

	Firma
Acrylamid-Gel	
Acrylamid/bis-Acrylamid 40% Lösung	Sigma
Ammoniumpersulfat	Amresco
Bromphenolblau	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
ΦX-174-RF DNA, Hae III Digest	Amersham Biosciences
Glycerin	Merck
N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin	Fluka
PCR	
10x PCR Puffer (100mM Tris-HCL, pH 9.0, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl)	Amersham Biosciences
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
LightCycler Fast Start Plus DNA Master SYBR Green I Kit	Roche
LightCycler RT-PCR-Primer (human)	MWG-Biotech
GAPDH-Primer (human)	MWG-Biotech
IFNγ-Primer (human)	MWG-Biotech
TNFα-Primer (human)	Maxim Biotech
β-actin-Primer (human)	R&D Systems
IL-4 Primer (human)	MWG-Biotech
IL-5-Primer (human)	Maxim Biotech
$MgCl_2$ Lösung (25 mM)	Amersham Biosciences
rTaq-Polymerase (4 x 250 U)	Amersham Biosciences
TCR Vγ10-Primer	MWG-Biotech
TCR Vγ11-Primer	MWG-Biotech
TCR Vγ2-Primer	MWG-Biotech
TCR Vγ9-Primer	MWG-Biotech
TCR-Jγ2-Primer	MWG-Biotech
TCR-Jγp1-Primer	MWG-Biotech
TCR-Jγp2-Primer	MWG-Biotech
TCR-Jγp-Primer	MWG-Biotech
TGFβ1-Primer (human)	R&D Systems
TNFα-Primer (human)	MWG-Biotech
Ultrapure dNTP Set 2´-Desoxynukleosid 5´-Triphosphat	Amersham Biosciences
Zellkultur	
(methyl-^{3}H) Thymidin 5 mCi	Amersham Biosciences
Antibiotic-/Antimykotic-Lösung	Gibco
Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, Formula A	Gambro BCT
CD14 Microbeads human	Miltenyi Biotec
GM-CSF (1000U/ml)	Novartis
Hepes Puffer	Biochrom

humanes AB-Serum	PAN Biotech
IL-4 (1000U/ml)	R&D Systems
L-Glutamin	Biochrom
Medium RPMI-1640	Sigma
MEM Vitamine	Biochrom
Non-essential-amino-acids	Biochrom

LTT

Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Biosciences
Heparin-Natrium	Braun
$NiSO_4$ x 6 H_2O	Sigma
Phytohämagglutinin (PHA)	Biochrom
Tetanus Toxoid	Chiron Behring

DNA-/RNA-Isolierung

High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
RNase A Lösung (4mg/ml; >100u/mg)	Amersham Biosciences

Apoptose

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences

ELISA

OptEIA Human IFN-γ	BD Biosciences
OptEIA Human IL-4	BD Biosciences
OptEIA Human IL-12p70	BD Biosciences

Durchflusszytometrie

Cytofix/Cytoperm Plus™ Kit	BD Biosciences
Isotyp-Kontrolle (IgG_1 κ)	BD Biosciences
Isotyp-Kontrolle (IgG_{2a} κ)	BD Biosciences
antiCD3-PE	BD Biosciences
antiCD3-FITC	BD Biosciences
antiCD14-PE	BD Biosciences
antiCD14-FITC	BD Biosciences
antiCD25-PE	BD Biosciences
antiMHCI-PE	BD Biosciences
anti-MHCII-PE	BD Biosciences
antiCD80-PE	BD Biosciences
antiCD83-PE	BD Biosciences
antiCD86-PE	BD Biosciences
antiCD40-PE	BD Biosciences
anti IL-2-PE	BD Biosciences
anti IL-4-PE	BD Biosciences
anti IL-12-PE	BD Biosciences
anti IFNγ-PE	BD Biosciences
anti TNFα-PE	BD Biosciences
Paraformaldehyd	Sigma

allgemein:

Aqua ad iniectabilia	Braun
Borsäure	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
EDTA	Sigma
Essigsäure (96%)	Merck
Ethanol absolut	Merck
fötales Kälberserum	Sigma
Kalium-Dihydrogenphosphat	Merck
NaCl	Merck
Salzsäure (32%)	Merck
Trizma Base	Sigma

3.1.2 Geräte

Geräte	Firma
Automatic Filter Counting System Trace 96	Inotech
Binokular ID03	Zeiss
Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank	Napco
Cell Harvester	Inotech
diverse Flaschen, Meßzylinder, Kolben	
Elektronische Präzisionswaage	Kern
ELISA-Reader	Mikrotek
Gefrierschrank (-80℃)	GLF
Gelkammer V15 17	Gibco Life Technologies
Glashomogenisator (1ml)	Schubert + Weiss
Kühlschrank mit Gefriereinheit	Bosch
LightCycler 3.5	Roche
Magnetrührer IKA-Combimag RCH mit Heizplatte	Janke + Kunkel
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort
Multipette plus	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Zintl
pH-Meter PHM220	Radiometer
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Pipettensatz (0.5-1000µl)	Eppendorf
Steril-Bank	The Baker Company
Szintillations-Meßgerät Minaxi Tri-Carb 4000 Series	United Technologies Packard
Thermocycler iCycler (96 x 0,2ml)	Bio Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414	Eppendorf
Tischzentriguge 16/18	neo Lab
Vario MACS magnetisches Zellseparationsgerät	Miltenyi Biotec
Vortex	Bender + Hobein AG
Waage R300	Sauter
Wasserbad SW-20C	Julabo
Zentrifuge TJ-6	Beckmann

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

	Firma
0,2ml -PCR-Tubes	Eppendorf
0,5ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf
1,5ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf
15ml-Röhrchen	Greiner
24well Zellkulturplatten	Corning
50ml-Röhrchen	Greiner
96well Zellkulturplatten (Flachboden)	Greiner
96well Zellkulturplatten (Rundboden)	Nunc
Combitips plus 0,5ml	Eppendorf
Combitips plus 5ml	Eppendorf
Glaspipetten	
MACS Separation Columns (25LS)	Miltenyi Biotec
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
sterile Einmalskalpelle	Feather
sterile Pipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
sterile Plastikpinzetten	Angiokard

3.1.4 Puffer und Lösungen

10x Annexin V Binding Buffer:
- 0,1M Hepes/NaOH
- 1,4M NaCl
- 25mM $CaCl_2$
- pH 7,4

10x PBS (Phosphate-buffered saline):
- 80g NaCl
- 2g KCl
- 14,4g Na_2HPO_4
- 2,4g KH_2PO_4
- ad 1l H_2O

FACS-Puffer:
- 1x PBS
- 2% fötales Kälberserum
- frisch vorbereiten

Fixierlösung:
- 1g Paraformaldehyd
- ad 100ml 1x PBS
- zum Lösen auf ca. 70℃ erwärmen

„Coating”-Buffer:	- 4,2g $NaHCO_3$ - 1,78g Na_2CO_3 - ad 500ml H_2O; pH 9.5
Assay Diluent:	- 1x PBS - 10% FKS - pH 7,0
Waschpuffer:	- 1x PBS - 0,05% Tween-20
Stopplösung:	- 2N H_2SO_4
10x TBE-Puffer:	- 108g Trizma Base - 55g Borsäure - 40ml 0,5M EDTA (pH 8.0) - ad 1l H_2O dest.
NaAc-Puffer:	- 3M NaAc - pH 5,2
TE-Puffer:	- 10mM Tris - 1mM EDTA - pH 8,0
Lade-Puffer:	- 5ml Glycerin - 1ml Bromphenolblau - 1ml Xylene Cyanol - 27,5ml H_2O
MACS-Puffer:	- 45ml PBS - 5ml 6% ACDA - 250µl FKS

Trypanblaulösung:
- 0,9g NaCl
- 0,5g Trypanblaufarbstoff
- ad 100ml H_2O bidest
- mit 0,45µm Filter filtrieren

3.2 Blutspender und Gewebeherkunft

In dieser Arbeit wurden einerseits mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sowie als Gewebeproben Stanzbiopsien aus Epikutantestarealen und periimplantäres Gewebe aus Hüft-Revisionsoperationen verarbeitet. Eine Übersicht der Personendaten ist in Tabelle 2 aufgeführt. Blutspenden für die Zellkulturversuche erhielten wir zum einen von Nickel-allergischen Personen sowie nicht-allergischen Personen aus dem Patientengut unserer Klinik und andererseits auch von Klinikmitarbeitern. Insgesamt wurden für die verschiedenen Versuche Blutproben von 45 verschiedenen Personen verarbeitet. Es wurden für jeden Versuch ca. 40ml heparinisiertes Blut aus einer Armvene der volljährigen Spender abgenommen, nachdem diese ihr Einverständnis dazu gegeben hatten.

Bei Patienten, die im Rahmen der Abklärung einer Hauterkrankung einen Standard-Epikutantest erhalten hatten, wurden Stanzbiopsien aus dem Nickeltestfeld entnommen. Die Standardtestsubstanzen waren 2 Tage am Patientenrücken aufgeklebt. Am Tag nach der Testpflasterabnahme (Tag 3) erfolgte im Anschluß an die klinische Bewertung der Testreaktion eine Biopsie aus dem entsprechenden Testfeld. Dies wurde bei 10 Personen durchgeführt, die eine Ekzemreaktion im Nickeltestfeld zeigten („Nickel-allergische Blutspender“) und bei 5 Personen, die keine Reaktion im Nickeltestfeld hatten (nicht-allergische Kontrollpersonen). Alle Proben wurden von volljährigen Spendern gewonnen, die als Patienten bei der allergologischen Abklärung von Hauterkrankungen eine Hauttestung erhalten hatten und einer zusätzlichen Stanzbiopsie zu Forschungszwecken nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und mindestens 24h Bedenkzeit zugestimmt hatten. Der an der Entnahmestelle entstandene Hautdefekt wurde anschließend jeweils mit einer Einzelknopfnaht verschlossen und einem Pflaster versorgt.
Die periimplantären Gewebeproben von insgesamt 30 Patienten wurden von der orthopädischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen von notwendig gewordenen

Revisionsoperationen künstlicher Hüftgelenke (CoCrMo-Legierung: 65,2% Cobalt, 27,3% Chrom, 0,3% Nickel, 5,4% Molybdän, 0,23% Eisen sowie 0,8% Mangan) gewonnen, nachdem die Patienten nach einem ausführlichen Beratungsgespräch ihr Einverständnis zu dieser zusätzlichen Gewebeentnahme zu Forschungszwecken gegeben hatten.

Versuch (Kapitel)	Blutspender/ Patienten	Alter (Jahre)	m/w	Material
Metalltoxizität (4.1)	5 gesunde Kontrollen	32-55	3m, 2w	Blut
Apoptose (4.2)	7 Nickel-Allergiker 9 Kontrollen	21-50 26-55	1m, 6w 3m, 6w	Blut Blut
Dendritische Zellen (4.3)	10 Nickel-Allergiker 10 Kontrollen	21-64 22-71	10w 4m, 6w	Blut Blut
Zellkulturparameter , Kinetik (Proliferation, ELISA, Klonalität, RT-PCR; 4.4 und 4.6)	10 Nickel-Allergiker 5 Kontrollen	25-55 32-45	10w 2m, 3w	Blut Blut
Analyse (Klonalität) der PBMC nach Stimulation (4.5)	10 Nickel-Allergiker 5 Kontrollen	21-60 35-72	2m, 8w 2m, 3w	Blut Blut
Zytokinbestimmung (Durchflusszytometrie; 4.7)	5 Nickel-Allergiker 5 Kontrollen	25-50 35-46	1m, 4w 2m, 3w	Blut Blut
Analyse (Klonalität) der Epikutantestbiopsien (4.8.1)	10 Nickel-Allergiker 4 Kontrollen	21-60 35-72	2m, 8w 2m, 2w	Gewebe Gewebe
Analyse von periimplantärem Gewebe (4.8.2)	17 Personen mit Hüft-Endoprothesen-Revision	55-91	7m, 10w	Gewebe
Analyse von periimplantärem Gewebe (LightCycler; 4.8.3)	13 Personen mit Hüft-Endoprothesen-Revision	43-85	8m, 5w	Gewebe

Tabelle 2: Übersicht über das Kollektiv der Blutspender und die Herkunft der Gewebeproben, die in den Versuchen verarbeitet wurden

3.3 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus dem peripheren Blut

Den Patienten wurde aus der Armvene 20-40ml Heparinblut abgenommen und ca. 15-30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Ficoll-Hypaque wurde ebenfalls auf Raumtemperatur erwärmt. In 15ml Röhrchen wurde 5ml Ficoll pipettiert und danach etwa 7 ml Heparinblut vorsichtig darübergeschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 min bei 1800 rpm (20℃). Ficoll hat eine Dichte von 1.07 und

trennt die PBMC von den Erythrozyten und Granulozyten ab. Das Serum / Plasma wurde nach der Zentrifugation aus der obersten Phase abgenommen und bei –80℃ gelagert. Der Lymphozytenring wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieses füllte man mit RPMI 1640-Medium auf und zentrifugierte nochmals bei 1200 rpm und 20℃ für 10 min (Waschschritt). Der Überstand wurde abgekippt und das Röhrchen ein zweites Mal mit Medium gefüllt. Nach dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (10 min, 1200 rpm, 20℃) wurden die Zellen in 10 ml komplettem Me dium (Zusatz von 1% bzw.10% humanem AB-Serum, HEPES 25mM, L-Glutamin, Antibiotic-Antimycotic-Lösung, NEAA und MEM-Vitaminen) aufgenommen und gezählt. Dazu wurden 10µl aus der Zellsuspension entnommen, in 190µl 3% Essigsäure gegeben, gut gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und die vier Großquadrate ausgezählt.

Dabei kommt folgende Berechnung zur Anwendung:

$$\text{Zellzahl/µl} = \frac{gezählte\ Zellen}{h\ x\ Fläche\ x\ Verdünnung}$$

wobei h = 1/10

Fläche = 4

Verdünnung = 1/20

Anschließend wurde die Zellzahl mit komplettem Kulturmedium auf $0{,}75 \times 10^6$/ml eingestellt.

3.4 Trypanblaufärbung (Toxizitätsbestimmung)

Nach der Kultur der Zellen unter Exposition verschiedener Metallsalze wurde die 96well-Platte (Platte mit 96 Vertiefungen für die Zellkultur) für 5min bei 1200rpm abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. 10µl der vorgewärmten Trypanblaulösung wurden pro well in die 96well Zellkultur-Platte gegeben. Danach wurde das Gemisch 5min bei 37℃ inkubiert und ansch ließend mit 0.9% NaCl-Lösung vorsichtig abgespült. Danach wurden die gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden pro well 200 Zellen gezählt. Die Angabe erfolgte als prozentualer Anteil toter oder geschädigter Zellen .

3.5 Apoptosebestimmung

Die Färbung mit Annexin V-FITC kann Apoptose in einem früheren Stadium identifizieren, als eine Analyse des DNA-Abbaus. Die Annexin V-Färbung zeigt den

Verlust der Membranintegrität, der auch die letzten Stadien des Zelltodes charakterisiert. So muß die Färbung immer zusammen mit einem Lebendfarbstoff, wie z.B. Propidiumiodid (PI), durchgeführt werden, um frühe apoptotische Zellen zu identifizieren [110]. Das Ausmaß der gefundenen Apoptose wurde als Anteil (in Prozent) apoptotischer Zellen (Annexin V-positiv, PI negativ) der Gesamt-PBMC angegeben.

Die Zellen aus dem Stimulationsansatz wurden zweimal mit je 1ml kaltem PBS gewaschen und anschließend jeweils bei 1500rpm für 5min bei 4℃ abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils einfach abgekippt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml mit 1x „Binding Buffer“ eingestellt. Jeweils 100µl der Zellsuspension wurden in vier verschiedene FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend gab man entweder 5µl Annexin V-FITC, 5µl PI, beide Stoffe in Kombination oder nichts dazu (ungefärbte Kontrolle). Die Röhrchen wurden sanft gemischt und 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Zuletzt wurden je 400µl 1x „Binding Buffer“ pro Röhrchen zugegeben und die Proben innerhalb der nächsten Stunde mittels Durchflusszytometrie (FACScan) gemessen.

3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der LTT existiert seit 1962 in mehreren Varianten und wurde für die verschiedensten Substanzen angewendet. Er stellt ein In-vitro-Verfahren zur Diagnostik einer T-lymphozytären Sensibilisierung vom verzögerten Typ dar. Es werden über Ficoll gereinigte PBMC mit den interessierenden möglichen Allergenen kokultiviert. Man kann zwischen 0,5x10^6/ml und 1x10^6/ml Zellen/ml im LTT einsetzen, bei unseren Versuchen hat sich eine Zellzahl von 0,75x10^6/ml als ideal für den LTT mit AB-Serum-komplettiertem Kulturmedium herausgestellt. Gemessen wird die Proliferation dieser Zellen nach der Inkubation mit dem Allergen im Vergleich zum spontanen Proliferationsverhalten (ohne Allergen). Als Positivkontrolle wurde in unserem Falle zum einen Phytohämagglutinin (PHA) als Pan-T-Zell-Mitogen und zum anderen Tetanus Toxoid (TT) als typisches Recall-Antigen eingesetzt. Als Maß für die Zellproliferation wurde die Einbaurate von Tritium markiertem Thymidin herangezogen, welche als Stimulationsindex angegeben wurde:

$$SI = \frac{cpm\ stimulierte\ Zellen}{cpm\ unstimulierte\ Zellen}$$

Je nach Autor werden als Untergrenze für einen „positiven“ SI Werte zwischen 1,5 und 4 herangezogen. Wir sahen einen SI ≥ 3 als „positiv“ an.

Bei unseren Versuchen wurden folgende Stimuli verwendet:

Stimulus	**Konzentration der Stammlösung**	**Gebrauchs-lösung**	**Endkonzentration**
TT	50 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml
PHA	240 µg/ml	240 µg/ml	24µg/ml
$NiSO_4$ x 6 H_2O	10^{-3}M	10^{-3}M / 10^{-4}M / 10^{-5}M	10^{-4}M / 10^{-5}M / 10^{-6}M

Die Stimuli (20µl/well) wurden in die 96well-Platte mit Zellen einpipettiert, dabei erfolgte jeder Stimulationsansatz als Vierfachwert. Danach wurde die Platte für 5 Tage bei 37℃, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchte inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20µl ^{3}H-Thymidin (1:30 in RPMI 1640-Medium verdünnt) und eine weitere Inkubation für 16 Stunden. Die 96well-Platte wurde mindestens für 4-5 Stunden eingefroren (-80℃). Zuletzt wurde die Platte wieder aufgetaut, mit dem Zellharvester die Zellen geerntet und auf Filterpapier übertragen. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem β-Counter.

3.7 Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen

Die Anleitung zur Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen (DZ) erfolgte über die Arbeitsgruppe von Hr. Prof. Dr. M. Röcken (Betreuung durch Hr. Dr. K. Ghoreschi) in unserer Klinik, wobei die Kulturbedingungen an unsere Fragestellung angepaßt wurden.

PBMC wurden aus Heparinblut über Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert, gewaschen und gezählt (s. 3.3, S. 23). Danach wurden die Zellen in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (10min, 1200rpm, 4℃). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in 30µl CD14-Beads (= mit anti-CD14-Antikörpern beschichtete magnetische Partikel) und 120µl MACS-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min im Kühlschrank. So wurden die $CD14^+$ Monozyten mit den magnetischen Beads markiert. Das magnetische Zellseparationsgerät wurde gründlich mit Ethanol abgewischt. Die nächsten Schritte erfolgten alle unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank. Die Trennsäule wurde in den Magneten eingehängt und mit 1ml MACS-Puffer vorgespült. Die Zellen wurden

mit 5ml MACS-Puffer gewaschen und danach abzentrifugiert (10min, 1200rpm, 4℃). Anschließend resuspendierte man das Zellpellet in 2ml MACS-Puffer und pipettierte die Lösung auf die Säule. Nun bleiben die $CD14^+$ Zellen in der Säule hängen, da die magnetischen antiCD14-tragenden Beads an dem Magneten fixiert werden. Zellen, die kein CD14 an der Oberfläche exprimieren, laufen durch die Säule und werden unten in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Um eine größere Ausbeute zu erhalten, wurde der Durchlauf noch einmal auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule 2x mit je 3ml MACS-Puffer gespült. Um die $CD14^+$ Zellen von der Säule zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magneten herausgenommen und auf ein 15ml Röhrchen gestellt. 5ml MACS-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und mit dem sterilen Stempel durchgedrückt. Dieses wurde noch ein zweites Mal mit weiteren 5ml MACS-Puffer wiederholt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10min, 1200rpm, 4℃) und mit PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10min, 1200rpm, 4℃) wurden die Zellen mit Medium gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (10min, 1200rpm, 4℃) wurden die Zellen in komplettem RPMI 1640-Medium (+Zusätze und 1% AB-Serum) aufgenommen. In einer 6well-Platte wurden pro Stimulationsansatz 2ml Zellsuspension eingesetzt. Um Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen zu gewinnen wurde zusätzlich in jedes well 40µl GM-CSF (2000U/ml) und 40µl IL-4 (1000U/ml) zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation im Brutschrank über 6 Tage bei 37℃ und 5% CO_2, wobei jeweils nach 2 Tagen eine weitere Zugabe von GM-CSF und IL-4 erfolgte. Nach 6 Tagen Inkubation wurden nach Mediumwechsel folgende Stimuli zugefügt:

- 200µl Medium
- 200µl LPS (1µg/ml)
- 200µl $NiSO_4$ 10^{-3}M
- 200µl NiSO4 10^{-4}M

Es erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 Oberflächenfärbung

Die Zellen aus dem jeweiligen Stimulationsansatz wurden abzentrifugiert (5min, 1500rpm, 4℃) und in 50µl PBS pro spezifischer Färbung aufgenommen. Je 50µl der Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und je 3µl spezifischer FITC- oder PE-markierter Antikörper zugegeben. Folgende Antikörper wurden in den verschiedenen Versuchen verwendet:

- Isotypkontrolle (IgG1κ-PE, IgG2aκ-FITC)
- anti CD3-PE
- anti CD3-FITC
- anti CD14-PE
- anti CD14-FITC
- anti CD25-PE
- anti MHCI-PE
- anti MHCII-PE
- anti CD80-PE
- anti CD83-PE
- anti CD86-PE
- anti CD40-PE

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Zuletzt wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend sofort im FACScan gemessen.

3.8.2 Intracytoplasmatische Färbung

Für die intracytoplasmatische Färbung wurde der Cytifix/Cytoperm Plus™ Kit von BD Biosciences verwendet. Dieser beinhaltet eine Lösung für die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und eine Verdünnungs- und Waschlösung. Zusätzlich umfasste der Kit das „GolgiStop™ Reagenz“. Dieses enthielt Monensin, einen Inhibitor des Proteintransportes. Die Zugabe dieses Inhibitors in die Stimulationsansätze blockiert die intrazellulären Transportprozesse. Dies führt zu einer Akkumulierung der exprimierten Zytokine im endoplasmatischen Retikulum und verstärkt so das Färbesignal.

Die Zellen aus dem jeweiligen Stimulationsansatz wurden abzentrifugiert (5min, 1500rpm) und in 50µl PBS pro spezifischer Färbung aufgenommen. Es erfolgte

zunächst eine Oberflächenfärbung mit anti CD3-FITC-Ak (s.a. 3.8.1). Nach der 30minütigen Inkubation mit dem CD3-FITC-Antikörper wurden die Zellen zweimal mit je 100µl PBS gewaschen, wobei zwischendurch jeweils 5min bei 1500rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt einfach abgekippt. Anschließend wurde 50µl der „CytoFix“-Lösung in jedes Röhrchen pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation für 15min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben zweimal mit je 100µl „PermWash“ (Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit PBS) gewaschen, wobei zwischendurch jeweils 5min bei 1500rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde ebenfalls nach jedem Zentrifugationsschritt abgekippt. Die intrazytoplasmatischen spezifischen Antikörper wurden 1:20 in sterilem PBS verdünnt. Je 5µl der Antikörperlösung wurden in jedes Röhrchen pipettiert und zuletzt 50µl „PermWash“ zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 15min bei Raumtemperatur im Dunklen. Die Zellen wurden wiederum zweimal mit je 100µl „PermWash“ gewaschen und dazwischen jeweils für 5min bei 1500rpm abzentrifugiert. Abschließend wurden die Proben entweder direkt im FACSscan gemessen oder mit je 200µl Paraformaldehyd (2% in PBS) fixiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert (bis zu 5 Tage). Bei der Messung erfolgte die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität, sowie der Anteil der spezifisch gefärbten Zellen (in Prozent) unter den Gesamt-T-Zellen. In der Auswertung wurde die Änderung der mittleren Fluoreszenz gegenüber der nur mit Medium stimulierten Kultur (Leerwert) angegeben.

3.9 ELISA

In unseren Versuchen verwendeten wir den OptEIA™ Human IL4-, IFNγ- und IL12p70-Kit der Firma BD Biosciences. Als Proben wurden Zellkulturüberstände aus Stimulationsansätzen (Doppelwerte) eingesetzt. Eine 96well Platte wurde mit je 100µl „Capture“ Antikörper pro well befüllt, die Platte verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag entfernte man die Flüssigkeit aus den wells und wusch 3x mit je 300µl Waschpuffer (s. 3.1.4, S. 20)) pro well. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Platte umgedreht auf saugfähiges Papier gelegt um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen. Anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt mit je 200µl „Assay Diluent“ (enthält 10% FKS) pro well mit einer Inkubation bei Raumtemperatur über 1 Stunde. Wieder wurde die Flüssigkeit entfernt und anschließend 3x mit Waschpuffer gewaschen (s.o). Nun wurde aus dem

mitgelieferten Standard eine Verdünnungsreihe erstellt und die Proben mit „Assay Diluent“ passend verdünnt. 100µl jeder Standardverdünnung sowie 100µl der Proben und der Kontrollen wurden in die jeweiligen wells pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten dieses Mal 5 Waschschritte. 15min vor dem nächsten Schritt pipettierte man den „Working Detector“ zusammen (Detection Antikörper + Avidin-HRP-Reagenz) und gab diesen dann (100µl/well) hinzu. Es erfolgte eine weitere Inkubation für eine Stunde. Nun erfolgten 7 Waschschritte. Zuletzt gab man 100µl der Substratlösung (TMB = Tetramethylbezidin und H_2O_2) zu jedem well hinzu und inkubierte die Platte unverschlossen für 30min bei Raumtemperatur im Dunklen. Danach wurde die Stoplösung hinzugegeben und der Farbumschlag in den einzelnen wells sofort im Meßgerät gemessen (A450nm-A570nm). Die einzelnen Meßwerte wurden anhand einer Standard-Verdünnungsreihe ermittelt. Es wurden Mittelwerte der jeweiligen Doppelwerte angegeben.

3.10 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit® von Roche verwendet. Die Methode basiert auf der Lyse der Zellen während einer Inkubation mit Proteinase K in Anwesenheit eines chaotropen Salzes (Guanidin-HCl), das unmittelbar alle Nukleasen inaktiviert. Die Nukleinsäuren binden dann selektiv an spezielle Glasfasern, mit denen kleine Säulen gepackt sind. Die gebundene DNA wird daraufhin mehreren Waschschritten unterworfen um kontaminierende Zellkomponenten zu entfernen. Heparinisierte Proben können auch aufgearbeitet werden, da in dem Kit ein spezieller „Inhibitor Removal Buffer“ enthalten ist. Als letzter Schritt wird die gebundene DNA mit einem Puffer mit geringem Salzgehalt von den Glasfasern eluiert. Die in dem Kit enthaltene Proteinase K musste in 4,5 ml Aqua bidest gelöst werden, der „Inhibitor Removal Buffer“ wurde mit 20 ml absolutem Ethanol und der Waschpuffer mit 80 ml absolutem Ethanol verdünnt.

Je nach Ausgangsmaterial (Gewebe oder PBMC aus Zellkultur) waren verschiedene Vorbereitungen nötig. Das Gewebe (25-50mg) wurde mit einem Einmalskalpell sorgfältig zerkleinert und mit 200µl PBS in einem Homogenisator gründlich homogenisiert. Danach kam die Lösung in ein steriles 1.5ml Eppendorf-Tube, es wurden 200µl „Tissue Lysis Buffer“ (4M Harnstoff, 200mM Tris, 20mM NaCl, 200mM EDTA, pH 7,4) und 40µl Proteinase K dazu pipettiert und gründlich gemischt. Das

Gemisch wurde bei 55℃ inkubiert, bis das Gewebe komplett verdaut war. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 200µl „Binding Buffer“ (6M Guanidin-HCl, 10mM Harnstoff, 10mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH 4,4).

PBMC aus Kultur oder nach der Isolierung über einen Ficoll-Dichtegradienten wurden abzentrifugiert (1500rpm, 5min) und in 200µl PBS aufgenommen. Es wurden 200µl „Binding Buffer“ zugegeben.

Anschließend wurden beide Ausgangsmaterialien auf die gleiche Art und Weise weiter aufgearbeitet. Es erfolgte eine Inkubation bei 72℃ für 10 Minuten. Es wurden 100µl Isopropanol zur Fällung der DNA dazu pipettiert, die Lösung sorgfältig gemischt und auf die Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation (8000rpm, 1min) wurde der Durchlauf verworfen und es wurden 500µl „Inhibitor Removal Buffer“ darauf pipettiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation (8000rpm, 1min), der Durchlauf wurde wieder verworfen und es wurden 500µl Waschpuffer darauf pipettiert. Dieser Waschschritt wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Nach Verwerfung des Durchlaufes zentrifugierte man ein weiteres Mal nur 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit, um den restlichen Waschpuffer gründlich zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen auf ein steriles 1.5 ml Eppendorf-Tube gesetzt, 200µl Elutionspuffer (auf 70℃ vorgewärmt) darauf pipettiert und wiederum zentrifugiert (8000rpm, 1min). Die gewonnene DNA wurde anschließend einem RNase-Verdau unterzogen.

RNase-Verdau

Zu den 200µl DNA wurden 3µl RNase A gegeben und die Probe 60min bei 37℃ inkubiert.

Phenolisierung

Anschließend erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt über Phenol. Nach Zugabe von 200µl eines Gemisches von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 100µl TE-Puffer wurde die Lösung gründlich gemischt (Vortex). Nach einer Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit für 3min wurde der wäßrige Überstand in ein neues steriles 1,5ml Eppendorf-Tube überführt.

Ethanolfällung

Die wäßrige Lösung wurde mit 1/10 des Volumens einer 3M Natriumacetat-Lösung und dem zweifachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt. Danach wurde das Gemisch 15-30min auf Eis oder bei –20℃ inkubiert u nd anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und anschließend das Pellet mit je 1ml 70% Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet vorsichtig getrocknet und die DNA in 10µl TE-Puffer gelöst.

Konzentrationsbestimmung der DNA

1µl der in 10µl TE-Puffer gelösten DNA wurde 1:20 in Aqua bidest verdünnt und in einem Photometer bei 260nm gemessen. Eine A_{260} Einheit entspricht dabei bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) 50µg/ml. Um die Reinheit der DNA zu berechnen, muß die Probe bei 280nm im Photometer gemessen werden. Lag der Wert von $A_{260}/A_{280} > 1,8$, konnte die DNA für die weiteren Versuche verwendet werden, in anderen Fällen musste die DNA weiter aufgereinigt werden.

3.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

GAPDH-Kontrolle

Zunächst erfolgte eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das Glycerinaldehyphosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH) als Kontrolle um die Qualität der DNA zu prüfen. Folgende Bestandteile wurden in einem 0,2ml PCR-Tube zusammen pipettiert.

- Aqua bidest 26 µl
- 10x PCR Puffer 5 µl
- $MgCl_2$ 2,5 µl
- Nukleotide 2 µl
- Primer-Mix 10 µl
- DNA 2,5 µl

Die PCR-Reaktion wurde als „Hot start“-PCR durchgeführt, d.h. die Proben wurden 5min im Thermocycler inkubiert und erst danach wurden 0,5µl Taq-Polymerase (1:4 mit Aqua bidest verdünnt) dazugegeben. Anschließend wurde folgendes Programm des Thermocyclers gestartet:

35x
- 1 min 95℃ Denaturierung
- 1 min 64℃ Annealing
- 1 min 72℃ Elongation

1x	7 min 72℃	Auffüllen der Lücken in der dsDNA
	kühlen bei 4℃	

20µl aus jeder PCR-Reaktion wurden auf ein 6% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Es wurde ein Polyacrylamidgel verwendet, um schärfere Banden zu erhalten, da die Größenunterschiede bei der anschließenden Klonalitätsanalyse relativ gering waren. Der Gellauf erfolgte bei 160 Volt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Zuletzt wurde das Gel photografiert.

Klonalitätsanalyse

Die Analyse beinhaltete vier verschiedene PCR-Reaktionen, um die vier Hauptfamilien des T-Zell-Rezeptors (TZR) γ abzudecken (Vorgehen gemäß Graf et al. [52]). Diese Methode wird routinemäßig in unserer Klinik zur Analyse von vorherrschenden oligoklonalen/monoklonalen T-Zell-Populationen in der Lymphomdiagnostik eingesetzt. Daneben kann die Methode natürlich auch zur Beurteilung potentiell vorhandener (nach Antigenexposition) klonal expandierender T-Zell-Populationen eingesetzt werden. Dabei bedeutet klonale Expansion nicht zwangsläufig Malignität. Die Methode wurde in Absprache mit PD Dr. C. Sander in unserer Klink aus seinem Labor übernommen und an unsere Bedingungen adaptiert. Die gewonnenen Daten wurden zusätzlich von PD Dr. C. Sander begutachtet und bewertet. Um einen möglichst großen Bereich der γ-Kette des T-Zellrezeptor-Gens abzudecken, wurden Primer der vier Hauptgruppen der variablen Regionen (Vγ1-8, Vγ9, Vγ10 und Vγ11) mit einem Primer-Mix bestehend aus vier Joining-Primern (Jγ2, Jγp, Jγp1 und Jγp2) kombiniert (Abb. 2). Die Genabschnitte Vγ1-Vγ8 wurden anhand des Konsensusprimers Vγ2 analysiert. Folgende spezifische Primer wurden verwendet:

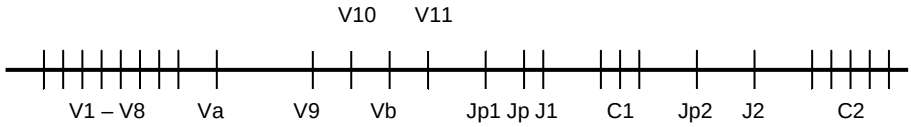
TCR-Vγ2:	5´- TAC ATC CAC TGG TAC CTA CAC CAG – 3´
	Produkt 206bp
TCR-Vγ9:	5´- GAA AGG AAT CTG GCA TTC CGT CAG – 3´
	Produkt 130bp
TCR-Vγ10:	5´- AAG CAA CAA AGT GGA GGC AAG AAA G – 3´
	Produkt 110bp
TCR-Vγ11:	5´- AGT AAA AAT GCT CAC ACT TCC ACT TC – 3´
	Produkt 90bp

TCR-Jγ2: 5´- TAC CTG TGA CAA CAA GTG TTG TTC – 3´

TCR-Jγp: 5´- AAG CTT TGT TCC GGG ACC AAA TAC – 3´

TCR-Jγp1: 5´- GAA GTT ACT ATG AGC TTA GTC CCT T – 3´

TCR-Jγp2: 5´- GAA GTT ACT ATG AGC CTA GTC CCT T – 3´



Aufbau des Gamma-T-Zellrezeptorgens: J (joining region), C (constant region), V (variable region)

Abstände der ausgewählten Primer von der Junktionszone

Abb. 2: Aufbau des T-Zell-Rezeptor-γ-Gens und Lokalisation der spezifischen Primer (modifiziert nach Graf et al. [52])

Folgende Bestandteile wurden in einem 0,2 ml PCR-Tube zusammen pipettiert.

- Aqua bidest 27,5 µl
- 10x PCR Puffer 5 µl
- $MgCl_2$ 1 µl
- Nukleotide 2 µl
- Primer-Mix 10 µl
- DNA 2,5 µl

Die PCR-Reaktion wurde als „Hot start"-PCR durchgeführt (5min Inkubation bei 95℃, danach Zugabe von 0,5µl Taq-Polymerase, 1:4 mit Aqua bidest verdünnt). Anschließend wurde folgendes Programm des Thermocyclers gestartet:

45x (1 min 95℃ Denaturierung
1 min 60℃ Annealing
1 min 72℃ Elongation)

1x 7 min 72℃ Auffüllen der Lücken in der dsDNA
kühlen bei 4℃

Wie bei der GAPDH-Kontrollreaktion wurden 20µl aus jeder PCR-Reaktion auf ein 6% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 160 Volt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Zuletzt wurde das Gel photografiert.

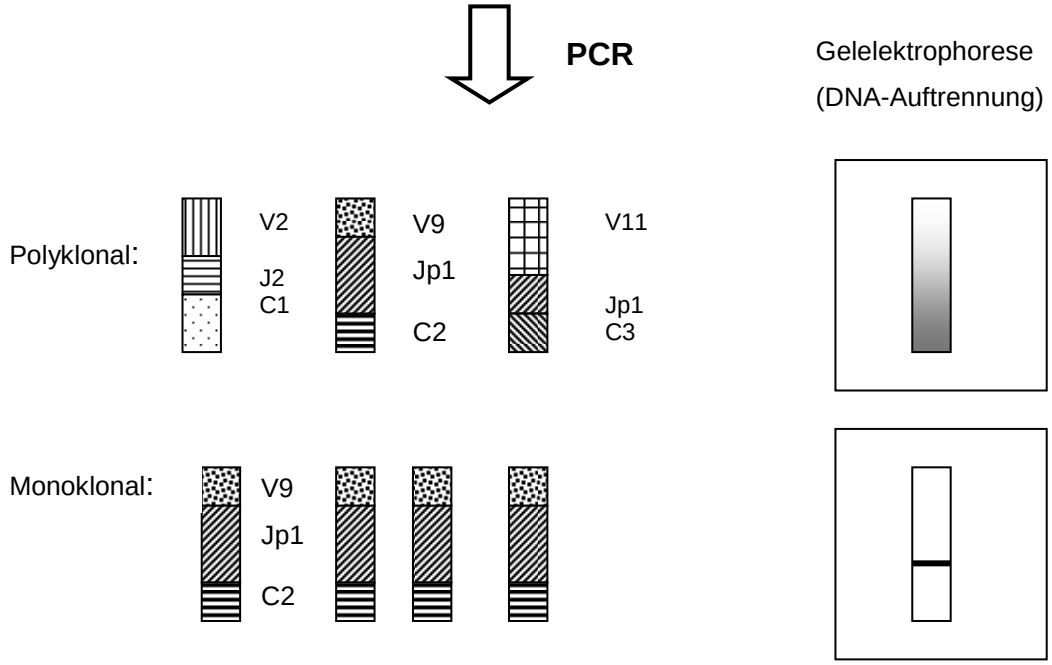


Abb. 3: Darstellung eines verwaschenen („polyklonal“) oder distinkten („oligoklonal“) Signals nach der Klonalitäts-PCR und der Auftrennung der Fragmente in einem Polyacrylamidgel.

Eine klare, schmale und distinkte Bande wurde als „positives“ Ergebnis gewertet. Eine breite, verwaschene oder auch mehrere Banden sprechen für ein unspezifisches oligoklonales Signal (Abb. 3). Die Bewertung erfolgte nach zusätzlicher Begutachtung der Bilder durch PD Dr. C. Sander.

3.12 RNA-Isolierung

Es wurde der High Pure RNA Isolation Kit® der Firma Roche verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Inkubation der Probe in einem speziellen Lyse-/Bindepuffer unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen. Im Falle einer RNA-Isolierung aus Gewebe benötigte man noch einen zusätzlichen Vorbehandlungsschritt zur Lyse. Die Nukleinsäuren werden in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an Glasfaseroberflächen gebunden. Die Bindebedingungen sind dabei für RNA optimiert. Durch eine DNAse I Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies in der

Säule werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach verschiedenen Waschschritten wird die RNA mit Wasser von der Säule eluiert.

Als grundsätzliche Vorbereitung des Kits wurde die DNase I in 550µl Elutionspuffer aufgenommen und aliquotiert bei –20℃ gelagert. Zus ätzlich wurde Waschpuffer I mit 20 ml absolutem Ethanol und Waschpuffer II mit 40 ml absolutem Ethanol versetzt. Grundsätzlich wurden bei der RNA-Isolierung sterile Tubes und Filter-Pipettenspitzen verwendet und Handschuhe getragen.

Das Gewebe wurde mit einem Einmalskalpell zerkleinert, in 200µl PBS aufgenommen und in einem Homogenisator mit 400µl Lyse-/Bindepuffer homogenisiert. Zellen aus Kultur oder nach der Ficoll-Dichtezentrifugation wurden analog in 200µl PBS aufgenommen und mit 400µl Lyse-/Bindepuffer versetzt. Danach wurde die Lösung in die mit dem Glasvlies gepackte Säule gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation (15sec) bei 10.000rpm wurde der Durchlauf verworfen. Für jede Probe wurde nun 90µl DNase Inkubationspuffer mit 10µl DNase I gemischt und direkt auf das Glasvlies pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15min bei Raumtemperatur. Die darauf folgenden Waschschritte beinhalteten einmal die Zugabe von 500µl Waschpuffer I mit anschließender kurzer Zentrifugation (15sec, 10.000rpm), einmal die Zugabe von 500µl Waschpuffer II mit anschließender Zentrifugation (15sec, 10.000rpm) und zuletzt die Zugabe von 200µl Waschpuffer II. Der Durchlauf wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Zuletzt wurde die Probe 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Reste des Waschpuffers zu entfernen. Danach wurde das Auffanggefäß verworfen und die Säule in ein steriles 1.5ml Tube gesetzt. Es wurden 60µl Elutionspuffer auf das Glasvlies pipettiert und die Probe 1min bei 10.000rpm abzentrifugiert. Anschließend kam die RNA-Lösung sofort auf Eis. Die RNA wurde bei –80℃ gelagert.

Konzentrationsbestimmung der RNA

1µl der RNA-Lösung wurde 1:20 in Aqua bidest verdünnt und in einem Photometer bei 260nm gemessen. Eine A_{260} Einheit entspricht dabei bei RNA 40µg/ml. Um die Reinheit der RNA zu berechnen, muß die Probe bei 280nm im Photometer gemessen werden. Lag der Wert von $A_{260}/A_{280} > 1,8$, konnte die RNA für die weiteren Versuche verwendet werden, in anderen Fällen musste die RNA weiter aufgereinigt werden (s.a. 3.10).

3.13 Reverse Transkription

Um die RNA in einer PCR-Reaktion amplifizieren zu können musste ein komplementärer DNA-Strang, die sogenannte cDNA, hergestellt werden. Dazu wurde der „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit®“ der Firma Roche benutzt. Dieser bedient sich der Transcriptor Reversen Transkriptase, einer neuen rekombinanten Reversen Transkriptase, die in *Escherichia coli* exprimiert wird. Das Enzym besitzt eine RNA-gerichtete DNA Polymeraseaktivität, eine DNA abhängige DNA Polymeraseaktivität, Entwindungsaktivität und letztendlich eine RNase H Aktivität, die die RNA in RNA:DNA Hybriden abbaut Das Enzym besitzt eine sehr hohe Thermostabilität, so dass es bei Temperaturen bis zu 65℃ benutzt werden kann. Um einen Überblick über die Genexpression der Zellen zu bekommen, wurden Not I-d$(T)_{18}$-Primer für die reverse Transkription benutzt, die komplementär zu dem polyA-Schwanz der mRNA sind.

2µg Gesamt-RNA aus Gewebe oder die gesamte RNA aus den Zellkulturansätzen (ca. 0.5µg) wurden jeweils umgeschrieben. Die RNA wurde in 12µl RNase-freiem H_2O aufgenommen und 1µl Oligo$(dT)_{18}$ Primer (2.5µM) hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 10min bei 65℃ inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt, um so eventuell vorhandene Sekundärstrukturen der RNA zu beseitigen. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

- 4µl Transkriptor RT Reaction Buffer (Endkonzentration 1x)
- 0.5µl Protector RNase Inhibitor (20U)
- 2µl Deoxynucleotide Mix (1mM jedes)
- 0.5µl Transcriptor Reverse Transcriptase (10U)

Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Reaktion über 30min bei 55℃. Durch einen folgenden Inkubationsschritt für 5min bei 85℃ wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Das Eppendorf-Gefäß mit der cDNA wurde danach bei -20℃ gelagert.

3.14 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

cDNA-Kontrolle

Zunächst erfolgte eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH) bzw. dem β-actin-Gen als Kontrolle um die Qualität der cDNA zu prüfen. Folgende Bestandteile wurden in einem 0,2 ml PCR-Tube zusammen pipettiert.

- Aqua bidest 26 µl
- 10x PCR Puffer 5 µl
- $MgCl_2$ 2,5 µl
- Nukleotide 2 µl
- Primer-Mix 10 µl
- cDNA 2,5 µl

Die PCR-Reaktion wurde als „Hot start"-PCR durchgeführt, d.h. die Proben wurden 5min im Thermocycler inkubiert und erst danach wurden 0,5µl Taq-Polymerase (1:4 mit Aqua bidest verdünnt) dazugegeben. Anschließend wurde folgendes Programm des Thermocyclers gestartet:

35x	1 min 95℃	Denaturierung
	1 min 64℃	Annealing
	1 min 72℃	Elongation
1x	7 min 72℃	Auffüllen der Lücken in der dsDNA
	kühlen bei 4℃	

20µl aus jeder PCR-Reaktion wurden auf ein 6% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Es wurde ein Polyacrylamidgel verwendet, um schärfere Banden zu erhalten. Der Gellauf erfolgte bei 160 Volt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Zuletzt wurde das Gel photografiert. Die Auswertung erfolgte über die jeweilige Bandenstärke. Dabei erfolgte eine Unterteilung in drei Signalstärken: „+" = schwache Bandenintensität (schwache Genexpression), „++" = mittlere Bandenintensität (mittlere Genexpression), „+++" = starke Bandenintensität (starke Genexpression).

3.15 Analyse der Genexpression

Es wurden PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern für TNFα, IFNγ, IL4 und IL5 durchgeführt. Die Primer hatten folgende Sequenzen:

GAPDH:
sense 5´- CTC ACT CAA GAT TGT CAG CAA TG – 3´
antisense 5´- GAG GGA GAT GCT CAG TGT TGG – 3´
→ T_a: 65℃ → 669bp Produkt

β-actin:
sense 5´- GGA GGG GCC GGA CTC GTC AT – 3´
antisense 5´- GCC AAC CGC GAG AAG ATG ACC – 3´
→ T_a: 55℃ → 766bp Produkt

IFNγ :
sense 5´- GCT CTG CAT CGT TTT GGG TTC TCT TGG – 3´
antisense 5´- GGC GAC AGT TCA GCC ATC ACT TGG – 3´
→ T_a: 65℃ → 398bp Produkt

TNFα:
sense 5´- GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG – 3´
antisense 5´- CAG ATA GAT GGG CTC ATA CCA GGG – 3´
→ T_a: 65℃ → 237bp Produkt

IL4 :
sense 5´- CGG ACA CAA GTG CGA TAT CAC C – 3´
antisense 5´- CCA ACG TAC TCT GGT TGG CTT CC – 3´
→ T_a: 65℃ → 331bp Produkt

IL5:
sense 5´- ATG AGG ATG CTT CTG CAT TTG – 3´
antisense 5´- TCA ACT TTC TAT TAT CCA CTC G – 3´
→ T_a : 55℃ → 405bp Produkt

Folgende Bestandteile wurden in einem 0,2 ml PCR-Tube zusammen pipettiert:

	GAPDH T_a: 64℃	**β-actin** T_a : 55℃	**TNFα** T_a: 64℃	**IFNγ** T_a: 64℃	**IL4** T_a: 64℃	**IL5** T_a: 55℃
H_2O	26	27,5	28,5	28,5	27,5	28,5
10x Puffer	5	5	5	5	5	5
$MgCl_2$	2,5	1	-	-	1	-
NTP	2	2	2	2	2	2
Primer	10	10	10	10	10	je 5
cDNA	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Die PCR-Reaktion wurde als „Hot start“-PCR durchgeführt (5min Inkubation bei 95℃, danach Zugabe von 0,5µl Taq-Polymerase, 1:4 mit Aqua bidest verdünnt). Anschließend wurde folgendes Programm des Thermocyclers gestartet:

35x	1 min 95℃	Denaturierung
	1 min 50-60℃	entspr. T_a
	1 min 72℃	Elongation
1x	7 min 72℃	Auffüllen der Lücken in der dsDNA
	kühlen bei 4℃	

20µl aus jeder PCR-Reaktion wurden auf ein 6% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 160 Volt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Zuletzt wurde das Gel photografiert. Die Auswertung erfolgte über die jeweilige Bandenstärke. Dabei erfolgte eine Unterteilung in drei Signalstärken: „+“ = schwache Bandenintensität (schwache Genexpression), „++“ = mittlere Bandenintensität (mittlere Genexpression), „+++“ = starke Bandenintensität (starke Genexpression).

3.16 Quantitative RT-PCR

Die RT-PCR ist eine etablierte Methode, um bestimmte DNA-Sequenzen (z.B. Gene) exponentiell zu vervielfältigen. Bei der herkömmlichen RT-PCR (s.o.) wurden die amplifizierten Produkte in einem Polyacrylamidgel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand der Bandenintensität.

Mit der RT-PCR im LightCycler ist es nun möglich, die erhaltenen Produkte zu quantifizieren. Hierbei kann eine absolute Quantifizierung anhand eines definierten Standards mit bekannter Molekülmenge erfolgen oder es wird das spezifische Produkt (z.B. IFNγ) im Verhältnis zu einem internen Standard (in diesem Fall beta-2-Mikroglobulin) bewertet. Ein wichtiger Vorteil des LightCyclers besteht in der sehr viel schnelleren Amplifikation und in der Verifizierung der Produkte über eine Schmelzkurve.

Aufbau des LightCyclers:

Das Gerät ist aus einer oberen und einer unteren Einheit aufgebaut. Die obere enthält die Heizspirale, die untere enthält die Temperaturkammer, die wiederum das Probenkarussel, das Fluorimeter, die Motoren, sowie die Energieversorgung enthält.

Arbeitsprinzip des LightCyclers:

Das Grundprinzip der Amplifikation der DNA ist gleich wie bei der herkömmlichen PCR. Es gibt jedoch einige bedeutende Unterschiede. Die Temperaturregulierung im LightCycler erfolgt über die Heizspirale. Die von ihr erzeugte warme Luft wird durch einen Ventilator (am Boden der Temperaturkammer) gleichmäßig in der Kammer verteilt, so dass um die Proben herum eine homogene Temperaturverteilung gewährleistet ist. Eine Abkühlung in der Wärmekammer wird durch die Zufuhr von Raumluft erreicht. Die Proben werden für die LightCycler-PCR in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Die Kapillaren haben einen Außendurchmesser von 1,55mm und sind 35mm lang. Das erforderliche Reaktionsvolumen ist mit 10-20µl sehr gering. Die Verwendung von Luft zur Wärmeregulation sowie das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Kapillaren ermöglicht die raschen Temperaturänderungen im LightCycler. Durch eine Lichtquelle in der PCR-Kammer werden die Proben mit einer Emissionswellenlänge von 470nm angeregt. Je nach Fluoreszenzträger der PCR-Reagenzien wird die Fluoreszenz von einem der drei Photodetektoren bei 530nm, 640nm oder 710nm gemessen. Bei der Verwendung von SYBR Green I (s.u.) erfolgt die Messung bei 530nm. Anhand der erstellten Schmelzkurve nach Abschluß der Amplifikation kann die Qualität des PCR-Produktes geprüft werden. Die Amplifikationsprodukte schmelzen rasch und vollständig bei einer produktspezifischen Temperatur. Das bedeutet, dass ein sauberes PCR-Produkt in der graphischen Darstellung der Schmelzkurve einen einzigen schmalen Peak ergibt, der dem Schmelzpunkt entspricht. Somit können spezifische von unspezifischen (mehrere Peaks) Produkten getrennt werden.

Im Falle meiner Arbeit wurde das „FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I“-Kit der Firma Roche verwendet. Dieser Kit enthält eine speziell für den LightCycler geeignete FastStart Taq DNA-Polymerase sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Die chemisch modifizierte Taq-Polymerase ist durch hitzeempfindliche Gruppen an einigen Aminoenden blockiert, so dass das Enzym bei Raumtemperatur (also bei allen Pipettierschritten) inaktiv ist. Das Enzym wird erst durch einen

Inkubationsschritt über 10min bei 95℃ aktiviert (s og. „Hot start“-Technik), was die Sensitivität der PCR deutlich erhöht, da die Amplifikation unspezifischer Primerbindungen bei niedrigen Temperaturen weitgehend ausgeschlossen ist.
SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch doppelsträngige DNA bindet. Der Farbstoff bindet bei jedem Amplifikationsschritt an das PCR-Produkt, welches dann mittels Fluoreszenz detektiert und quantifiziert wird.

Quantifizierung der Produkte:

Über eine Verdünnungsreihe (z.B. 1:10, 1:100, 1:1000. 1:10000) erstellt die LightCycler-Software eine Eichgerade, mit der automatisch die Anzahl an Kopien des spezifischen Produktes ermittelt wird. Zusätzlich amplifiziert man zu jeder Probe auch ein Referenzgen, ein sog. „housekeeping gene“, das in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird. In unserem Fall war es beta-2-Mikroglobulin, das als interner Standard fungierte. Nach der Bestimmung der Kopienzahl im Anschluß an eine PCR-Reaktion im LightCycler wird dann aus den beiden Kopienzahlen ein Verhältnis gebildet, z.B. IFNγ/beta-2-Mikroglobulin-Ratio. Die Quantifizierung erfolgte bei unseren Versuchen nach der sogenannten „Kalibrator-normierten“ relativen Quantifizierung. Durch diese Methode werden zum einen Unterschiede in Bezug auf Qualität und Quantität der cDNA in den unterschiedlichen Proben berücksichtigt, zum anderen gehen aber auch Unterschiede in der Amplifikationseffizienz der einzelnen Reaktionen in die Berechnung mit ein.

Pipettierschema:

Als erster Schritt wurde ein Gefäß mit dem Reaktions-Mix aufgetaut (im Dunklen) und dieser Mix mit jeweils 14µl FastStart Taq Polymerase komplettiert. Dieses Gemisch wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt. Anschließend wurde der PCR-Mix vorbereitet und folgende Komponenten zusammenpipettiert:

- 5µl H_2O
- 0,5µl spezifischer Primer-Mix (10pmol jeder Primer)
- 2µl Master-Mix (5x konzentriert)

Die benötigte Anzahl an Kapillaren wurde in den vorgekülten Zentrifugationsadaptern bereitgestellt und 7,5µl des PCR-Mixes in jede Kapillare pipettiert. Zuletzt wurden noch 2,5µl der entsprechenden cDNA (1:10 verdünnt) hinzugefügt und die Kapillaren mit den passenden Verschlüssen abgedichtet. Nach einer Zentrifugation bei

2500rpm für 15sec wurden die Kapillaren in das LightCycler-Karussel überführt und die PCR wurde gestartet.

Da im LightCycler die Primer, die für die konventionelle PCR verwendet wurden, nicht optimal funktionierten (amplifizierte Produkte sollen im LightCycler nicht zu lang sein), wurden neue Primer getestet und folgende Primer letztendlich für die Versuche verwendet (T_a bei allen im LightCycler verwendeten Primern 60℃) :

β-2-microglobulin:
sense 5´ CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC 3´
antisense 5´ GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG 3´
→ 265bp Produkt

IL4:
sense 5´ TGC CTC CAA GAA CAC AAC TG 3´
antisense 5´ AAC GTA CTC TGG TTG GCT TC 3´
→ 235bp Produkt

IL5:
sense 5´ GCT TCT GCA TTT GAG TTT GCT AGC T 3´
antisense 5´ TGG CCG TCA ATG TAT TTC TTT ATT AAG 3´
→ 305bp Produkt

IL13:
sense 5´ CGG TCA TTG CTC TCA CTT GCC TT 3´
antisense 5´ TTA CCC CTA CCT AAC CCT CCT T 3´
→ 430bp Produkt

IFNγ :
sense 5´ GCA GAG CCA AAT TGT CTC CT 3´
antisense 5´ ATG CTC TTC GAC CTC GAA AC 3´
→ 260bp Produkt

IL6
sense 5´ GCC TTC GGT CCA GTT GCC TT 3´
antisense 5´ GCA GAA TGA GAT GAG TTG TC 3´
→ 542bp Produkt

IL8
sense 5´ ATG ACT TCC AAG CTG GCC GT 3´
antisense 5´ TCC TTG GCA AAA CTG CAC CT 3´
→ 82bp Produkt

Foxp3 :
sense 5´ CTG CCC CTA GTC ATG GTG G 3´
antisense 5´ CTG GAG GAG TGC CTG TAA GTG 3´
→ 72bp Produkt

IL10 :
sense 5´ TCA AGG CGC ATG TGA ACT CC 3´
antisense 5´ GAT GTC AAA CTC ACT CAT GGC T 3´
→ 176bp Produkt

TGFβ1:
sense 5´ CAA GCA GAG TAC ACA CAG CAT 3´
antisense 5´ TGC TCC ACT TTT AAC TTG AGC C 3´
→ 129bp Produkt

E-Selectin:
sense 5´ ACC TCC ACG GAA GCT ATG ACT 3´
antisense 5´ CAG ACC CAC ACA TTG TTG ACT T 3´
→ 173bp Produkt

bcl-2:
sense 5´ GGG AGA ACG GGG TAC GAC A 3´
antisense 5´ CCC AGA CTC ACA TCA CCA GAT 3´
→ 602bp Produkt

3.17 Datenauswertung und Statisitik

In dieser Arbeit wurden verschiedene In-vitro-Aspekte der allergischen Entzündung bei Nickelkontaktallergie anhand von Zellkulturansätzen und in Gewebeproben bearbeitet. Oft lagen dabei kleine Fallzahlen vor und die Ausprägung der Reaktionen zeigte bei teils großen interindividuellen Schwankungen meist keine Normalverteilung. So wurde nach Beratung durch Herrn Dr. Strobl vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität folgende Darstellung und Bewertung der Daten gewählt:

- Es erfolgte eine Auflistung der Einzelwerte sowie Säulengrafiken zur Darstellung der relativen Häufigkeiten von Merkmalsausprägungen.
- Es wurden bei der Zusammenfassung von Daten (z.B. Proliferationsausmaß der stimulierten T-Lymphozyten) Mittelwerte oder Median angegeben. Gab es bei den Einzelwerten eine zu breite Streuung wurde der Median gewählt um das Bild nicht zu verfälschen.
- Sofern statistische Beurteilung möglich war, wurde der Wilcoxon Rangsummentest verwendet. Dieses nicht-parametrische Verfahren vergleicht die „Mittelwerte“ zweier Stichproben. Es stellt eine Alternative zum sogenannten t-Test dar, sofern dessen Anwendungsvoraussetzungen stark

verletzt sind, d. h. wenn die Messwerte nicht normalverteilt oder die Varianzen der beiden Gruppen stark unterschiedlich sind. Der Rangsummentest vergleicht statt der Original-Messwerte die Rangwerte der Daten. Er prüft letztlich, ob die Zahl der Beobachtungen, die kleiner (oder größer) als der gemeinsame Median beider Variablen sind, in den beiden Gruppen verschieden ist.

- Teils konnten aber nur qualitative / quantitative Beurteilungen vorgenommen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Toxizitätsbestimmung verschiedener Metalle

4.1.1 Trypanblau-Exklusion

An isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 nicht-allergischen Blutspendern wurde in Vorversuchen die Toxizitätsschwelle gegenüber verschiedenen Metallen in der Zellkultur anhand einer Trypanblaufärbung bestimmt. Die Metalle wurden dabei als Einzelstimuli, aber auch in den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten als Doppelstimuli eingesetzt, um Effekte, die vielleicht durch die Spannungsreihe bedingt sind, mit einzuschließen. Dabei wurden bei Doppelstimulation jeweils nur die Hälfte der bei der Einzelstimulation eingesetzten Metallsalzmenge eingesetzt, so daß die Absolute Anzahl an Ionen gleich blieb. Die Ansätze wurden jeweils als Doppelwerte angesetzt, über 3 Tage inkubiert und anschließend mit Trypanblau gefärbt. Je 200 Zellen pro well wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Es zeigte sich zum einen, daß Monozyten und Lymphozyten jeweils leicht unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber den Metallen besaßen. Zum anderen gab es aber auch deutliche Unterschiede zwischen Einzel- und Doppelstimulation (Abb. 5-8). In Abb. 4 erkennt man den deutlichen Anstieg der Anzahl der lebenden Zellen zwischen den Konzentrationen 10^{-3}M und 10^{-4}M. In der Einzelexposition zeigte sich bei der Konzentration 10^{-3}M, daß Nickel sowohl für Lymphozyten als auch Monozyten toxischer war als Zink. Bei weiterer Verdünnung verliert sich dieser Unterschied.

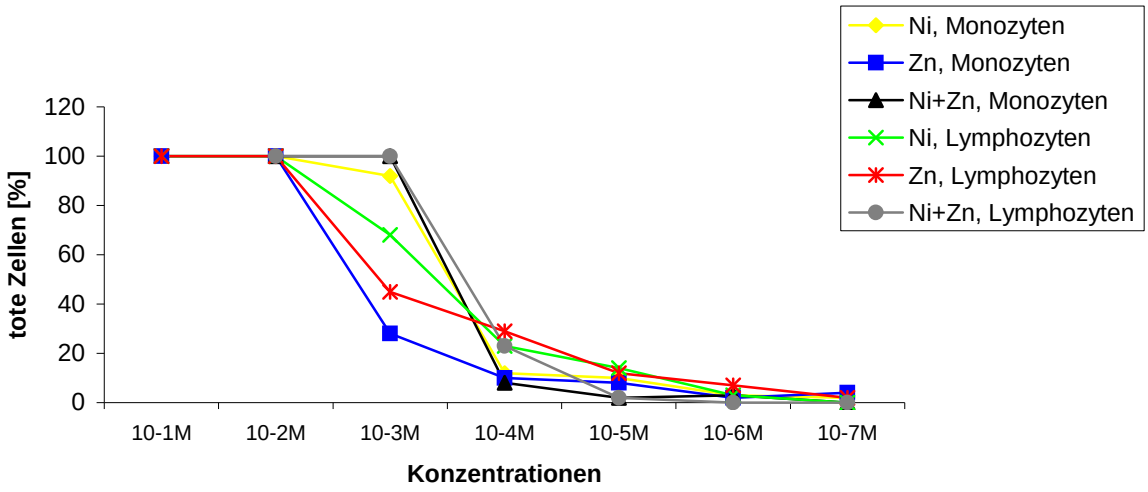


Abb. 4: Toxizität von Nickel und Zink (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

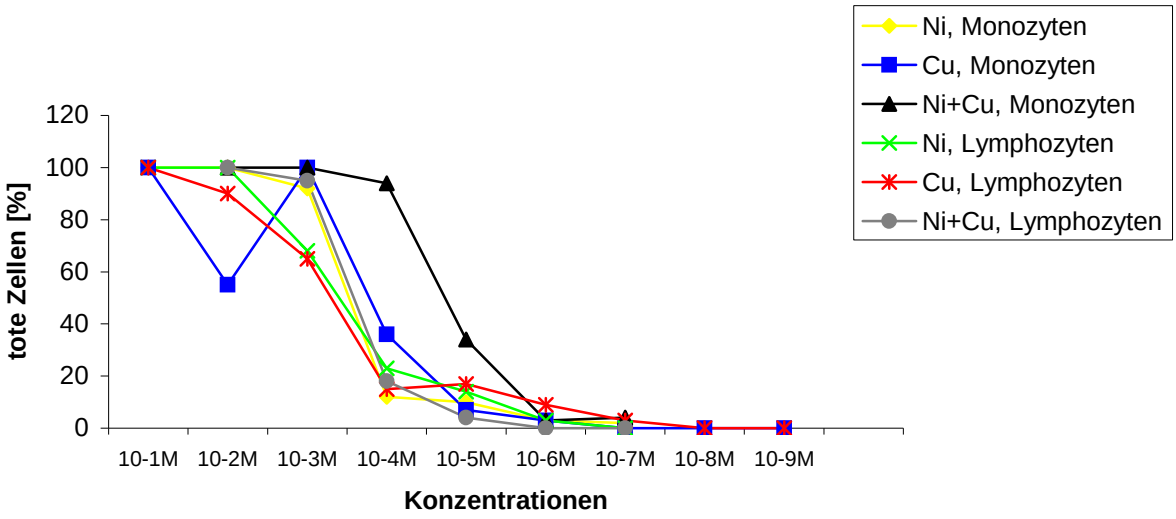


Abb. 5: Toxizität von Nickel und Kupfer (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

Abb. 5 zeigt die Ergebnisse der Toxizitätsbestimmung nach der Stimulation mit Nickel und Kupfer (jeweils alleine oder in Kombination). Hier unterscheidet sich die Reaktion der Monozyten auf Doppelstimulation mit Nickel und Kupfer deutlich von den jeweiligen Einzelstimulationen. Monozyten zeigten eine hohe Absterberate (über 50%) bei der Doppelstimulation mit Nickel und Kupfer im Konzentrationsbereich von 10^{-5}M bis 10^{-4}M. Die Doppelstimulation von Lymphozyten sowie jeweilige Einzelstimulationen von Monozyten oder Lymphozyten mit Nickel bzw. Kupfer führten zu entsprechenden Absterberaten erst bei deutlich höheren Konzentrationen (10^{-3}M und 10^{-4}M).

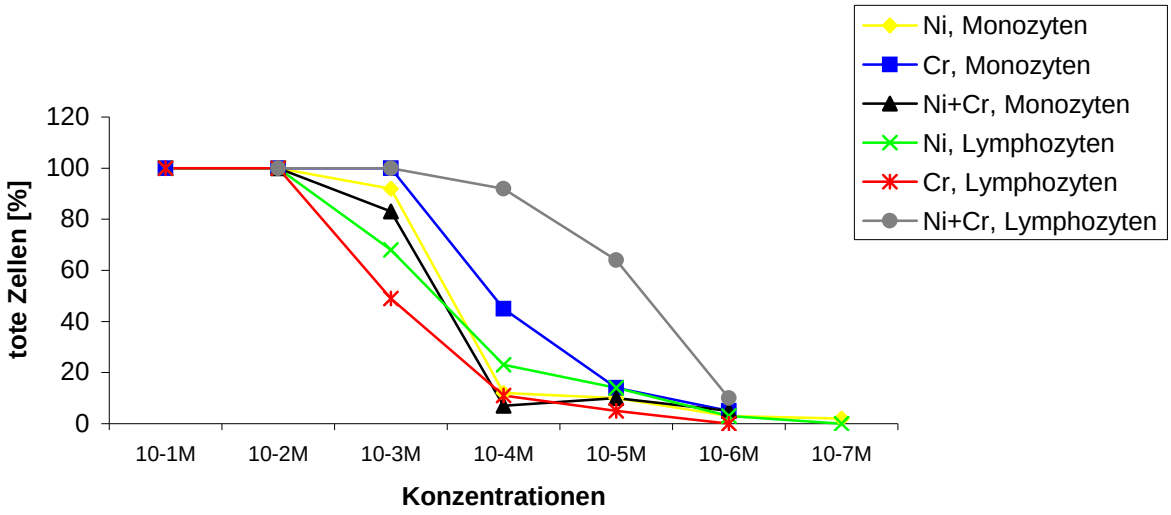


Abb. 6: Toxizität von Nickel und Chrom (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

Beim Stimulationsansatz mit Nickel und Chrom(III) (Abb. 6) fällt auf, daß die Lymphozyten im Vergleich mit den Monozyten stärker bei Doppelstimulation mit Nickel und Chrom absterben (speziell im Bereich von 10^{-5}M bis 10^{-4}M). Die Einzelstimulation und die Doppelstimulation der Monozyten zeigte keine Unterschiede. Bei diesen Ansätzen starben die Zellen v.a. im Konzentrationsbereich 10^{-4}M bis 10^{-3}M ab.

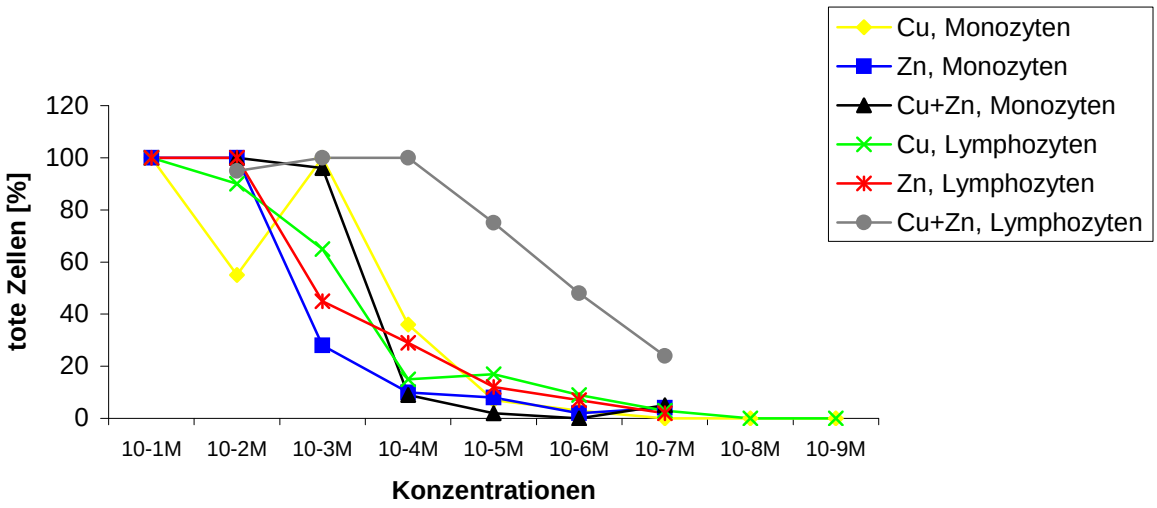


Abb. 7: Toxizität von Kupfer und Zink (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

Beim Stimulationsansatz mit Kupfer und Zink (Abb. 7) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Stimulation mit Nickel und Chrom. Die Lymphozyten starben im Vergleich mit den Monozyten stärker bei Doppelstimulation mit Kupfer und Zink (speziell im Bereich von 10^{-5}M bis 10^{-7}M) ab. Die Einzelstimulation und die Doppelstimulation der Monozyten zeigte keine Unterschiede. Bei diesen Ansätzen starben die Zellen v.a. im Konzentrationsbereich 10^{-4}M bis 10^{-3}M ab.

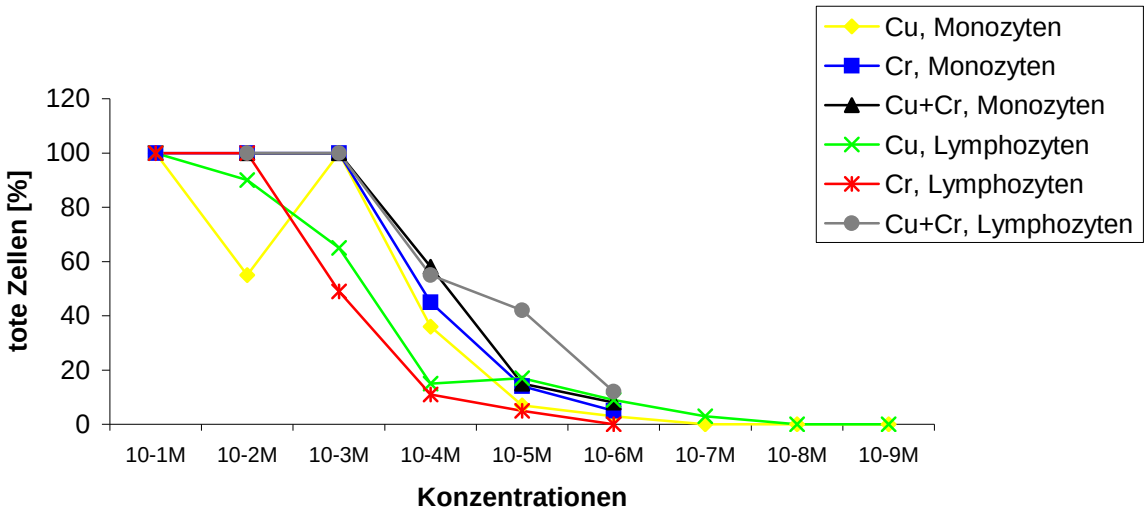


Abb. 8: Toxizität von Kupfer und Chrom (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

Die Stimulation von Monozyten und Lymphozyten mit Kupfer und Chrom (alleine oder in Kombination) führte zu ähnlichen Absterberaten (Abb. 8). Es zeigte sich eine tendenziell geringere Empfindlichkeit der Lymphozyten bei Einzelstimulation mit Kupfer und Chrom. Ein Anstieg der Absterberate erfolgte erst ab Konzentrationen von 10^{-3}M. Andererseits reagierten die Lymphozyten etwas empfindlicher auf die Doppelstimulation als die Monozyten (Beispiel 10^{-5}M: 40% der Lymphozyten abgestorben gegenüber 20% der Monozyten).

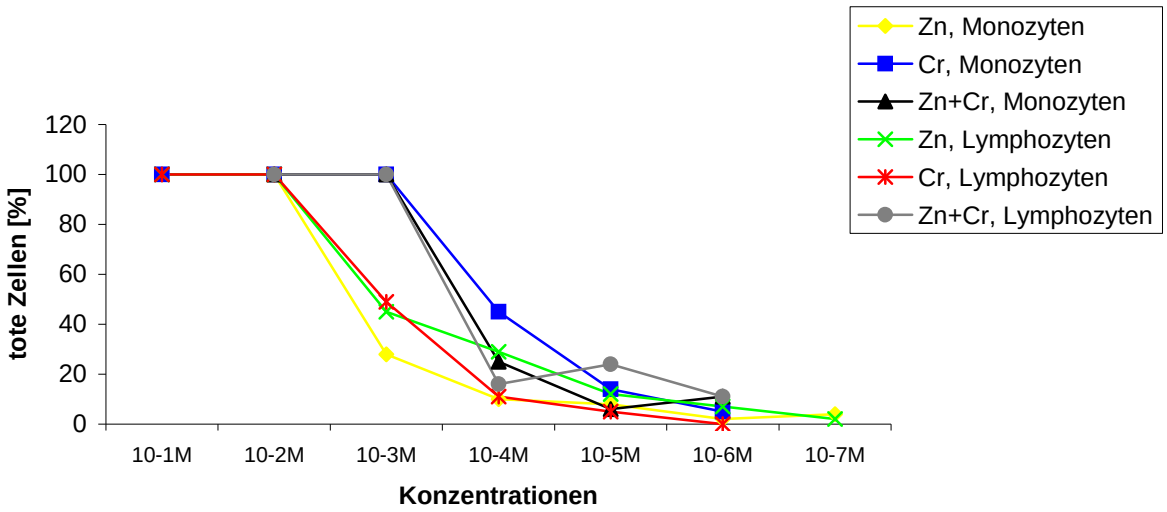


Abb. 9: Toxizität von Zink und Chrom (einzeln oder in Kombination) gegenüber isolierten Monozyten und Lymphozyten von 5 Personen. Bestimmung anhand der Trypanblaufärbung (tote Zellen = Trypanblau-aufnehmende Zellen). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung lag zwischen 10% und 20%.

Die Stimulation mit Zink und Chrom (jeweils alleine oder in Kombination) führte zu keinen unterschiedlichen Reaktionen der Lymphozyten und Monozyten (Abb. 9). Die Anzahl der lebenden Zellen nahm bei allen Stimulationen im Konzentrationsbereich von 10^{-4}M bis 10^{-3}M deutlich ab.

Aus den in Abb. 4 bis Abb. 9 aufgeführten Daten dieser Vorversuche wurden die Metallkonzentrationen ermittelt, bei denen mindestens 50% der Zellvitalität erhalten blieb. Diese Konzentrationen wurden als Maximalwerte in den anschließenden Versuchen, z.B. im LTT oder den Zellstimulationsversuchen eingesetzt.

4.1.2 Annexin V-Färbung

Anhand der gemeinsamen Suspension von Monozyten und Lymphozyten („PBMC“) wurde ergänzend der Anteil an apoptotischen Zellen bei Metallstimulation bestimmt. Dies erfolgte mittels einer Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und/oder Propidiumiodid. Die Analyse erfolgte über Durchflusszytometrie. Die Metallkonzentrationen wurden ab den vorab ermittelten vitalitätsbeeinträchtigenden Werten (Abb. 4 bis Abb. 9) eingesetzt.

Hierbei zeigte sich, daß der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin V positiv) bei einer Einzelstimulation größer war als bei den Doppelstimulationen, außer bei der

Kombination Zink und Chrom (Abb. 10). Bei den Einzelstimulationen befanden sich 7-11,38% der Lymphozyten in einem frühen Stadium der Apoptose, 10,76-24,5% waren bereits nekrotisch oder befanden sich in einem späten Apoptosestadium. Der höchste Apoptosewert wurde bei den Einzelstimulationen mit Zink erreicht (16,15% frühe Apoptose, 24,5% Nekrose). Demgegenüber war der Anteil an nekrotischen Zellen bei den Doppelstimulationen deutlich höher als bei den Einzelstimulationen. Bei diesen Stimulationen wurden nur 2,6-11,99% der Lymphozyten apoptotisch. Die Doppelstimulation mit Zink und Chrom führte in diesem Fall zum maximalen Wert von 11,99%. Auf der anderen Seite wurden bei den Doppelstimulationen Nekrosewerte von 32,55-42,33% erreicht.

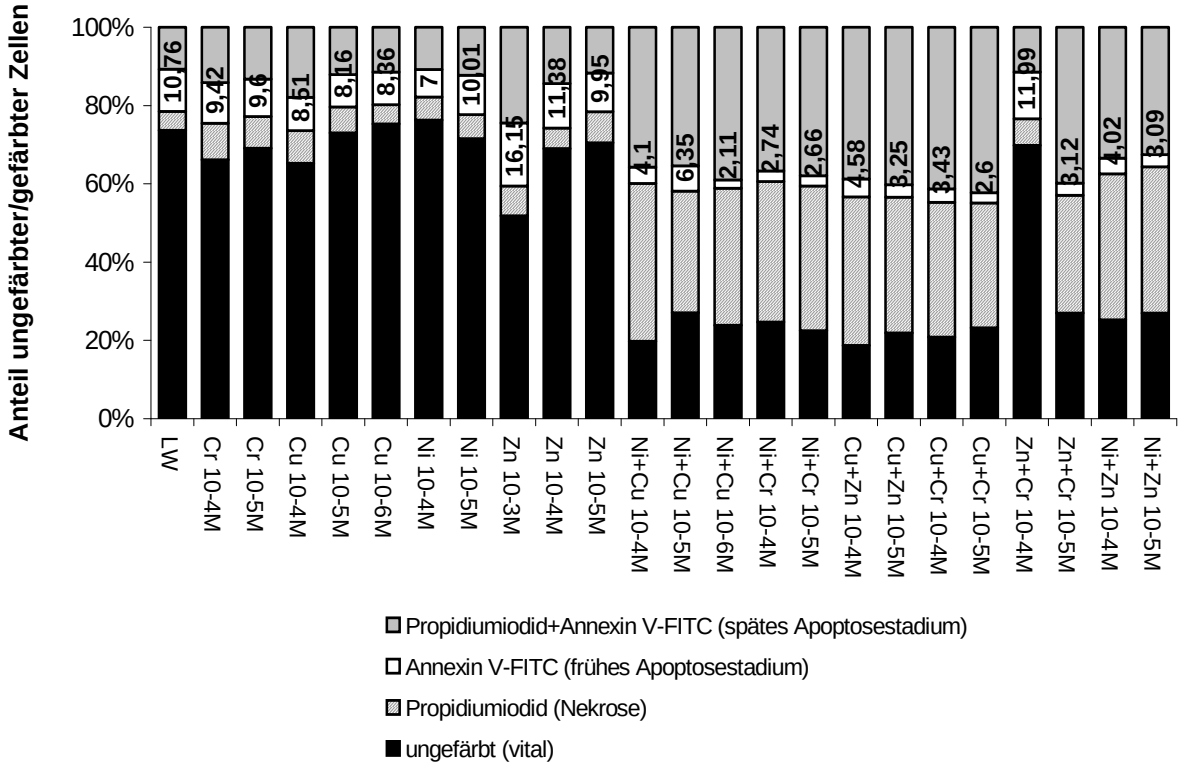


Abb. 10: Bestimmung der Apoptose bei PBMC von 5 nicht-allergischen Personen nach verschiedenen Metallstimulationen (einzeln oder in Kombination) über eine Annexin V-FITC und/oder Propidiumiodid-Färbung mit anschließender Analyse am FACScan. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der nur Annexin V positiv gefärbten Zellen, die sich in einem frühen apoptotischen Zustand befinden

Zusammenfassend zeigte auch die ergänzende Analyse von Apoptose und Nekrose in Metall-exponierten Zellen (Lymphozyten und Monozyten) ebenfalls den höher toxischen Effekt einer kombinierten Metallstimulation.

4.2 Apoptoseschwelle nach Nickel-Stimulation

Zur Frage ob der Spenderstatus („allergisch“ / „nicht-allergisch“) Einfluß auf das Apoptoseverhalten hätte, wurden Blutspenden von 7 Nickel-allergischen Blutspendern (6 w, 1 m: 21-50 Jahre) und 9 nicht-allergischen Kontrollen (6 w, 3 m: 26-55 Jahre) verarbeitet. Nach der Isolierung der PBMC aus dem heparinisierten Blut über Ficoll-Hypaque® Dichtezentrifugation wurden die Zellen in komplettem RPMI 1640 Medium (10% AB-Serum) über drei Tage kultiviert. Zusätzlich erfolgte über die drei Tage eine Stimulation mit PHA (2.4µg/ml), $NiSO_4$ 10^{-4}M und 10^{-5}M oder verschiedenen Verdünnungen eines Euro-Eluates. Die Euro-Münzen wurden als Modell einer Metalllegierung verwendet, die einen sehr hohen Anteil und eine hohe Freisetzung von Nickel aufweist.

Nach der Stimulation an Tag 3 wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit Annexin V-FITC und / oder Propidiumiodid (PI) gefärbt und anschließend im FACScan analysiert. Dabei wurde ein Gate für die Lymphozyten gesetzt und nur diese Zellpopulation analysiert.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität wurde dort die freigesetzte Nickel-Menge in den Eluaten über Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt (Tabelle 3).

	Eluent	**Eluat (1d) (Ni ng/ml)**	**Eluat (5d) (Ni ng/ml)**
Kontrolle	H_20	25	15
	künstlicher Schweiß	22	19
	Medium (+ 1% AB)	16	11
	Medium (+ 10% AB)	15	15
Euro	H_20	7800	19500
	künstlicher Schweiß	34300	72800
	Medium (+ 1% AB)	7100	8200
	Medium (+ 10% AB)	10400	30000

Tabelle 3: Nickelfreisetzung aus Euro-Münzen in verschiedenen Eluatmedien (H_2O, künstlicher Schweiß, Medium mit 1% oder 10% AB-Serum); 1d = Elutionsdauer 1 Tag; 5d = Elutionsdauer 5 Tage; Kontrolle = Eluationsmedium ohne Gegenwart der Euromünze; Bestimmung der Nickelkonzentration über Atomabsorptionsspektrometrie; weitere Abkürzungen s.a. Abkürzungsverzeichnis

In der Zellkultur wurden Verdünnungen der Eluate eingesetzt, die mit Medium unter Zusatz von 10% AB-Serum hergestellt worden waren. Die Anzahl der Zellen, die in Apoptose übergingen variierte deutlich je nach Art der Stimulation und der Menge an

$NiSO_4$ oder Euro-Eluat. Die höchste Apoptoserate trat nach der Stimulation der Lymphozyten mit PHA auf. Dabei zeigten die Zellen der nicht-allergischen Kontrollen eine höhere Apoptoserate als diejenigen der Nickel-allergischen Blutspender (19,3% gegenüber 15,4%). Nach der Kultur mit 10^{-4}M $NiSO_4$ gab es keine Unterschiede in der Apoptoserate (1,0% bzw. 0,9%), nach der Stimulation mit 10^{-5}M $NiSO_4$ traten dagegen geringe Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den beiden Gruppen auf (0,66% bzw 0,4%). Die Zugabe des 5-Tage-Euro-Eluates induzierte eine hohe Apoptoserate in den Lymphozyten, wobei sich Nickel-allergische und nicht-allergische Blutspender deutlich unterschieden. Bei der 1:100 Verdünnung zeigten die Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender im Mittel 4,9% apoptotische Zellen, die Kontroll-Lymphozyten dagegen 17,7%. Dieser Unterschied war fast signifikant (p = 0,053, Wilcoxon Rangsummentest). Bei den höheren Verdünnungen schwächte sich dieser Effekt ab. Bei der 1:1000 Verdünnung gingen 2,3% der Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender in Apoptose über gegenüber 12,2% der Kontroll-Lymphozyten, bei der 1:10000 Verdünnung waren es immerhin noch 1,8% bei den Nickel-allergischen und 6,5% bei den Kontroll-Blutspendern (Abb. 11). Bei Kultur mit Medium alleine ergab sich eine geringe Apoptoserate (zwischen 0,35% und 4,79%), die als Basiswert jeweils abgezogen wurde.

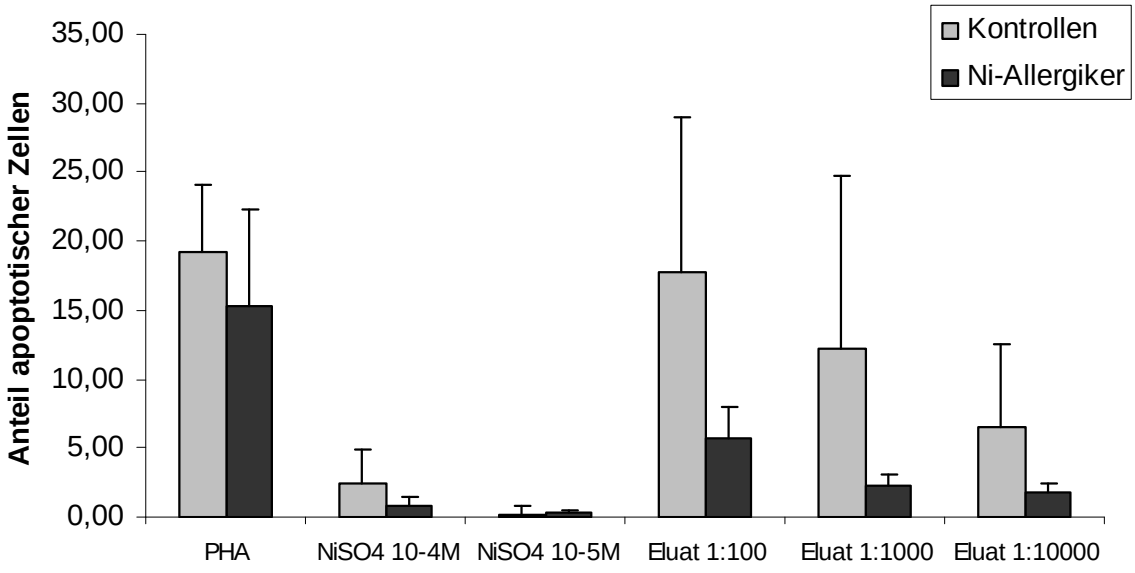


Abb. 11: Apoptoserate der Lymphozyten 7 Nickel-allergischer und 9 nicht-allergischer Kontrollpersonen nach Stimulation mit $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M) oder Euro-Eluaten (1:100, 1:1000, 1:10000). Angegeben ist der Prozentsatz an gefärbten Zellen (Annexin V, Mittelwert aus Doppelwerten);

Daß die Nickelfreisetzung aus Euromünzen bei längerem Hautkontakt bei entsprechend Sensibilisierten zur Ekzemreaktion führt, wird aus Abb. 12 erkennbar. Am Rücken einer Nickel-allergischen Patientin fand nach Applikation einer Euromünze im Epikutantest neben der bekannten Reaktion auf Nickel selbst (Rücken links) auch eine Reaktion im Eurotestfeld statt. Diese Patientin war ebenfalls als Blutspenderin bei der hier beschriebenen Versuchsserie in der Gruppe der Nickel-allergischen Blutspender vertreten. Bei der Patientin war wegen rezidivierendem Handekzem eine Epikutantest-Allergiediagnostik erfolgt, wobei sich auch eine Nickelkontaktallergie gezeigt hatte.

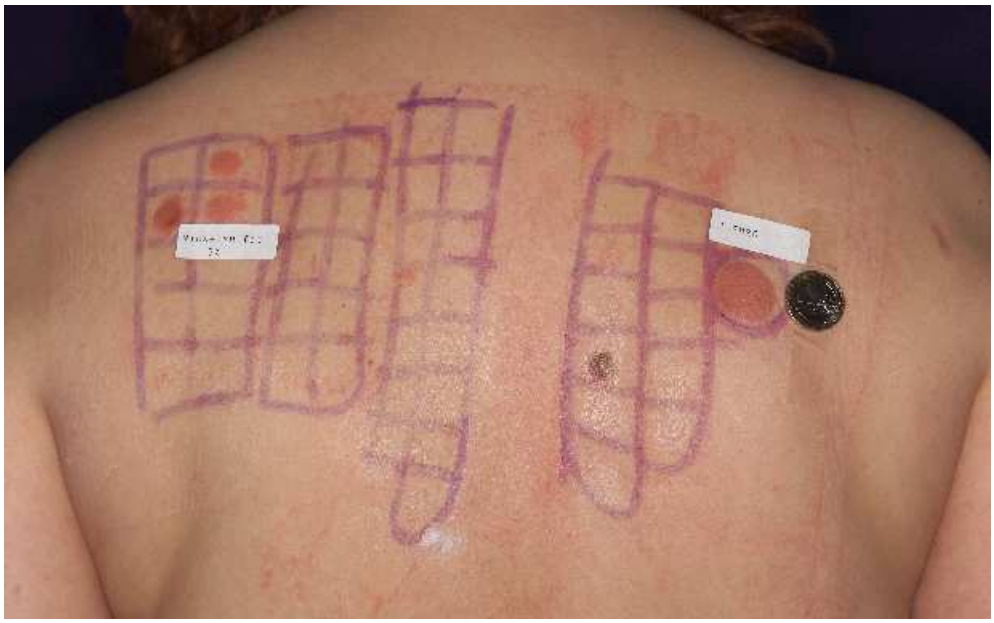


Abb. 12: Ekzemreaktion im Epikutantest einer Nickel-allergischen Patientin auf Nickel und eine Euro-Münze

Abb. 13 zeigt ein Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse von stimulierten Lymphozyten eines Nickel-allergischen und eines nicht-allergischen Blutspenders nach der dreitägigen Stimulation mit $NiSO_4$ oder den Euro-Eluaten. Als Ausdruck für die Apoptose wurde die Annexinfärbung herangezogen, als Marker für Nekrose eine Färbung mit Propidiumiodid. Auf die Stimulation mit $NiSO_4$ (10^{-4}M und 10^{-5}M) hin zeigten die Lymphozyten der Kontrollperson deutlich mehr Apoptose und Nekrose. Dieser Unterschied zeigt sich noch deutlicher nach der Stimulation mit den drei verschiedenen Konzentrationen des Euro-Eluates.

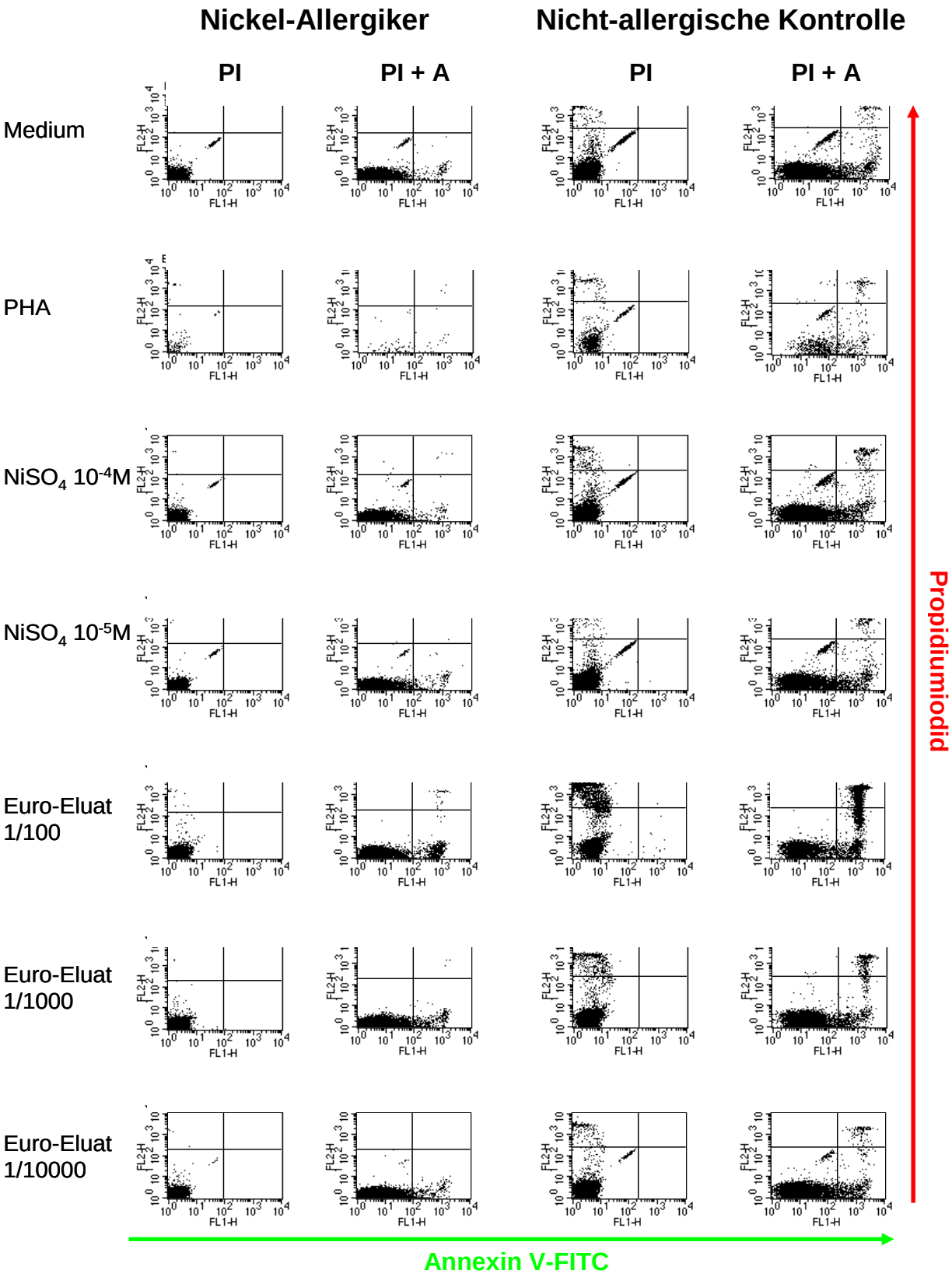


Abb. 13: Apoptoserate (Annexin V-Färbung) und Zellnekrose (Propidiumiodidfärbung) nach 24h; Exposition gegenüber Medium, PHA, $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M) und Euro-Eluat (1/100 – 1/10000). Darstellung mittels Durchflusszytometrie der Lymphozyten eines Nickel-allergischen und eines nicht-allergischen Blutspenders. Einzelfärbung mit Propidiumiodid (PI), die spezifisch für nekrotische Zellen ist, sowie die Doppelfärbung mit PI und Annexin V-FITC (PI + A), die zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen differenziert.

4.3 Reifung dendritischer Zellen (DZ) nach Nickelkontakt

Die Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen waren nach sechstägiger Stimulation mit GM-CSF und IL4 erhalten worden und dienten als Modell, um den Einfluß von Nickel auf eine weitere Reifung von DZ zu prüfen. Nach 48stündiger weiterer Kultur in Gegenwart von 10^{-5}M $NiSO_4$, 100ng/ml LPS oder Medium wurde eine Charakterisierung der Nickel- (oder zur Kontrolle LPS-) exponierten DZ vorgenommen. Das Medium, sowie das Nickel-enthaltende Medium wurden zusätzlich auf LPS-Verunreinigungen mit Hilfe des Rapid-Endotest (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium) untersucht und zeigten keine LPS-Kontamination.

Die Analyse der Oberflächenstrukturen (CD40, CD80, CD83, CD86, MHC Klasse I und MHC Klasse II) zeigte, daß bei Stimulation durch LPS eine Hochregulation speziell von CD80, CD83 und CD40 erfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Die LPS-Stimulation wurde durchgeführt, um nachzuweisen, daß die unreifen DZ zu einer weiteren Ausreifung gebracht werden konnten. In Abb. 14a sind die Phänotypänderungen nach der LPS-Stimulation dargestellt. Das Ausmaß der mittleren Fluoreszenzänderung war für die DZ der nicht-allergischen und die der Nickel-allergischen Blutspender ähnlich. Deutlich ist zu erkennen, daß CD80, CD83 sowie CD40 verstärkt exprimiert wurden ($p < 0,05$). Dabei war die Änderung der CD80 Expression mit einem über fünffachen Anstieg am größten, gefolgt von CD83 und CD40. Insgesamt zeigten die DZ der nicht-allergischen Kontroll-Blutspender etwas weniger Expression der entsprechenden Oberflächenantigene als die der Nickel-allergischen Blutspender. Nach der $NiSO_4$-Stimulation über 48h reagierten die DZ der Nickel-allergischen Blutspender mit Phänotypänderungen, v.a. bei der Expression von CD40 und CD83 (Abb. 14b). Während die CD83 Expression der nicht-allergischen Kontrollgruppe unverändert blieb, stieg die der Nickel-allergischen Blutspender deutlich an (30,11% vs –1,6%; $p < 0,05$). CD40 wurde dagegen von den DZ der nicht-allergischen Kontrollgruppe signifikant weniger produziert (-17%; $p < 0,05$). Zusätzlich stieg die MHC Klasse I Expression der Kontroll-DZ der nicht-allergischen Blutspender gegenüber den DZ der Nickel-allergischen Blutspender leicht an (Abb. 14b).

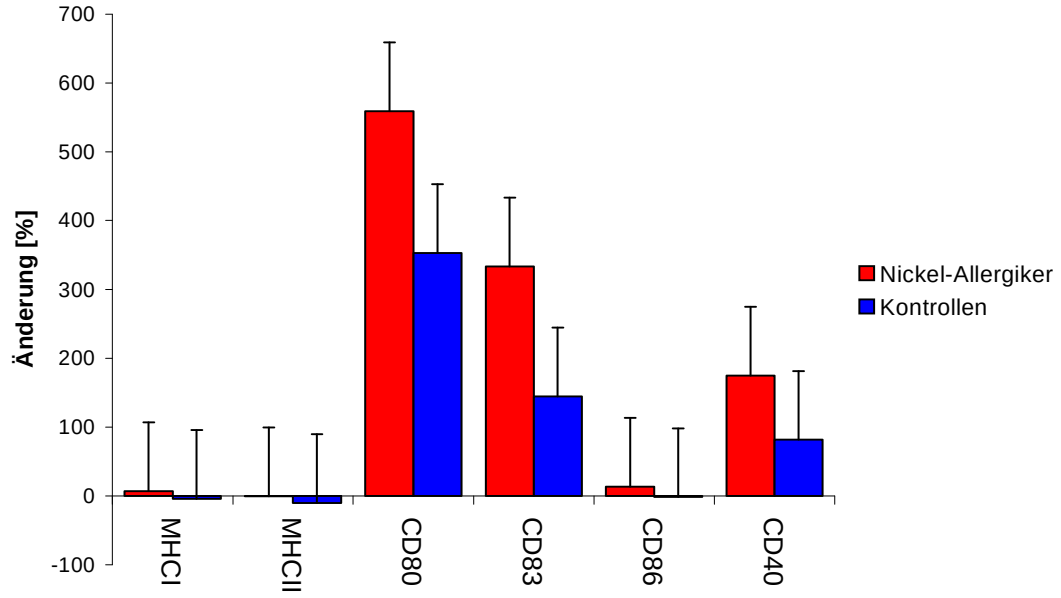


Abb. 14a

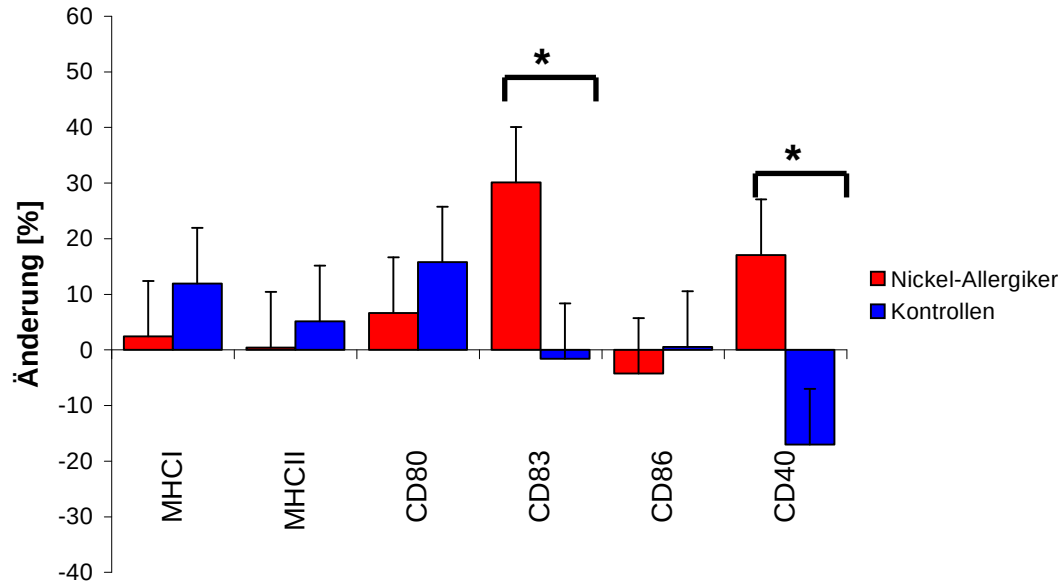


Abb. 14b

Abb. 14: Bestimmung der Änderung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen nach der 48h-Stimulation mit LPS (14a) oder $NiSO_4$ 10^{-5}M (14b) mittels Durchflusszytometrie (= 10 Nickel-allergische Blutspender; = 10 nicht-allergische Blutspender). Der Median der relativen Änderung zum Leerwert (Stimulation nur mit Medium) ist angegeben **; * =** $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummentest)

4.4 Einfluss von 1% und 10% AB-Serum auf Zellkulturparameter

4.4.1 Einfluss von 1% und 10% AB-Serum im Kulturmedium auf die Zellproliferation

In der Zellkultur wurde 6 Tage lang über den Einbau des radioaktiv markierten Thymidins die Proliferation der PBMC zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In einem ersten Ansatz erfolgten die gesamten Stimulationsversuche unter Zusatz von 1% humanem AB-Serum zu RPMI 1640-Medium. Abb. 15a zeigt die Stimulationsindices der Nickel-allergischen Blutspender an 5 verschiedenen Zeitpunkten, Abb. 15b stellt die entsprechenden Stimulationsindices der nicht-allergischen Kontrollpersonen dar. Mithilfe von PHA ließ sich bereits nach 96h eine maximale Proliferation der PBMC beider Gruppen erreichen. Im weiteren Verlauf der Stimulation nahm die Proliferation nach PHA-Stimulation wieder ab. Tetanus Toxoid als typisches „Recall"-Antigen bedingt eine vermutlich vom Immunisierungsstatus abhängige langsamere Steigerung der Proliferation. Die Proliferation nahm über den gesamten Stimulationszeitraum kontinuierlich zu und erreichte nach 144h das Maximum (bei Betrachtung des mittleren SI: Steigerung von 3,05 auf 16,725 bei Nickel-allergischen Blutspendern und von 0,96 auf 7,1 bei den nicht-allergischen Kontrollpersonen). Die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender zeigten nach der Stimulation mit $NiSO_4$ in drei Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) keine Unterschiede in der Proliferationsrate gegenüber den PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen. Da der Zusatz von 1% humanem AB-Serum zu keiner deutlich unterschiedlichen Proliferationsrate der PBMC Nickel-allergischer Blutspender und nicht-allergischer Kontrollpersonen führte, wurden die ansonsten unveränderten Stimulationsversuche nach Optimierung des Zellkulturmediums (Zusatz von 10% humanem AB-Serum) mit den gleichen Blutspendern durchgeführt. Jetzt wurden zusätzlich weitere, frühere Zeitpunkte (4h und 24h) untersucht, dafür aber die Kultur zur Bestimmung der Proliferation nur über 120h durchgeführt, da sich in den vorangegangenen Versuchen keine weiteren Änderungen zwischen 120h und 144h gezeigt hatten. Ausserdem erfolgte zusätzlich eine Analyse des Überstandes auf eine IFNγ-, IL4- sowie IL12p70-Freisetzung mittels ELISA.

In Abb. 16a sind die Proliferationsraten der Nickel-allergischen Blutspender und in Abb. 16b diejenigen der nicht-allergischen Kontrollpersonen dargestellt. Wiederum ließ sich unter PHA-Stimulation in beiden Gruppen eine maximale Proliferation

bereits sehr früh bestimmen (24h). Die Stimulation mit Tetanus Toxoid zeigte eine langsame und kontinuierliche Steigerung der Proliferation über die gesamte 120h-Dauer der Zellkultur. Unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum zum Kulturmedium war jetzt bei den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender nach Stimulation mit $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) eine deutlich gesteigerte Proliferation gegenüber den PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen sichtbar ($NiSO_4$ 10^{-4}M: Steigerung des SI-Mittelwertes von 1,02 auf 27,86 vs 1,29 auf 1,75). Dabei stiegen die SI der Nickel-allergischen Blutspender nach 120h auf die maximalen Werte an. Die PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen zeigten bei Stimulation mit der höchsten Nickel-Konzentration (10^{-4}M) eine geringe Proliferationszunahme (Abb. 16b).

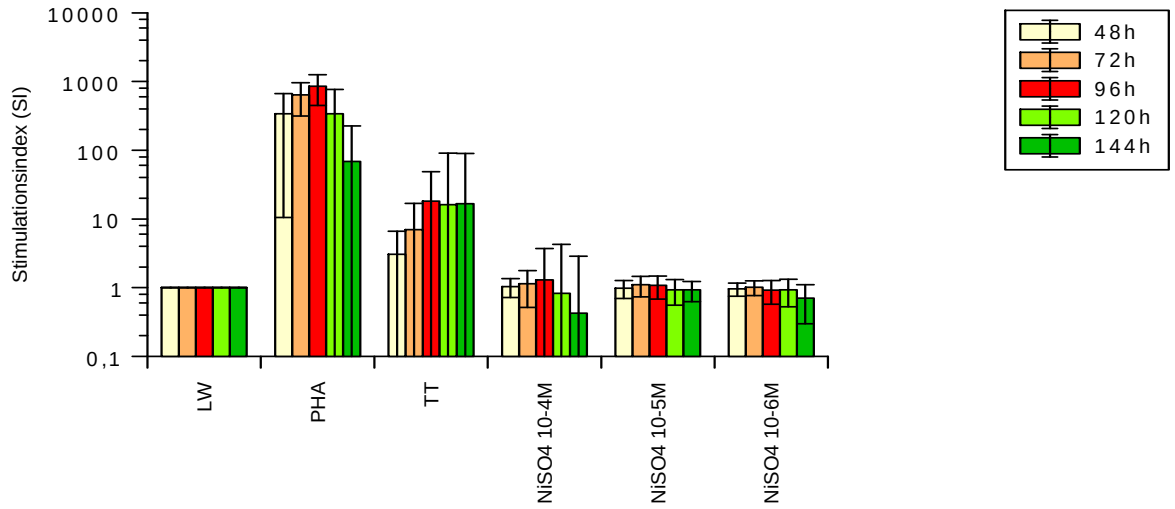


Abb. 15a

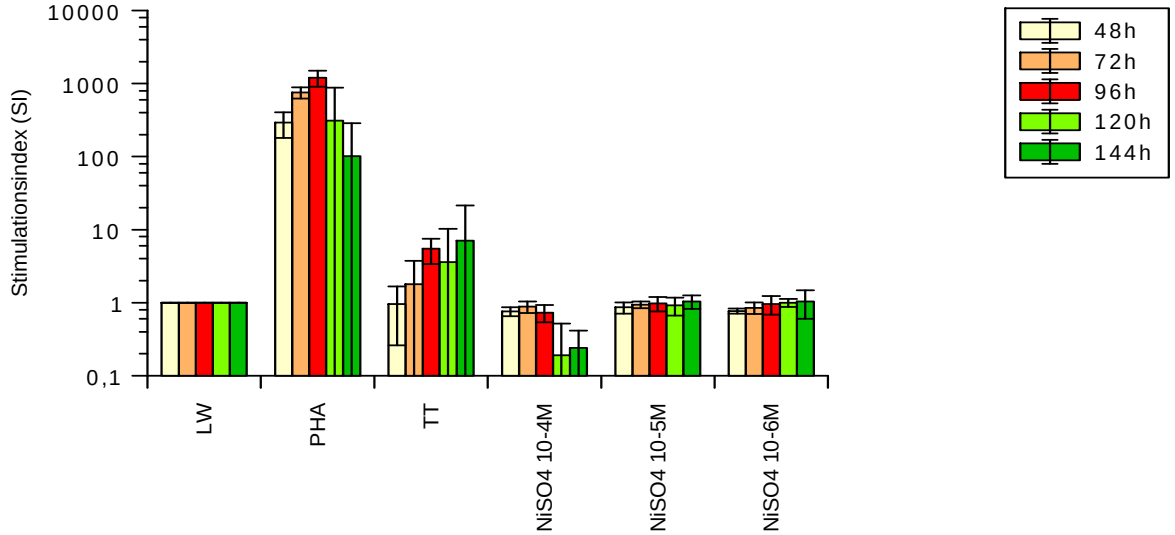


Abb. 15b

Abb. 15: Proliferation der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (a) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (b) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zusatz 1% humanes AB-Serum); angegeben ist jeweils der Mittelwert des SI

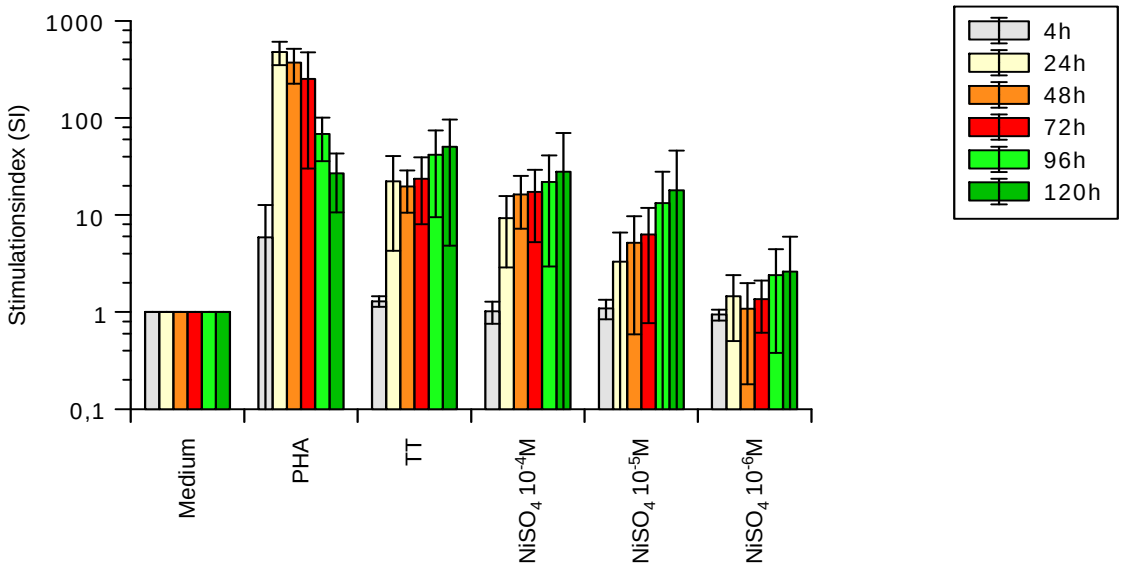


Abb. 16a

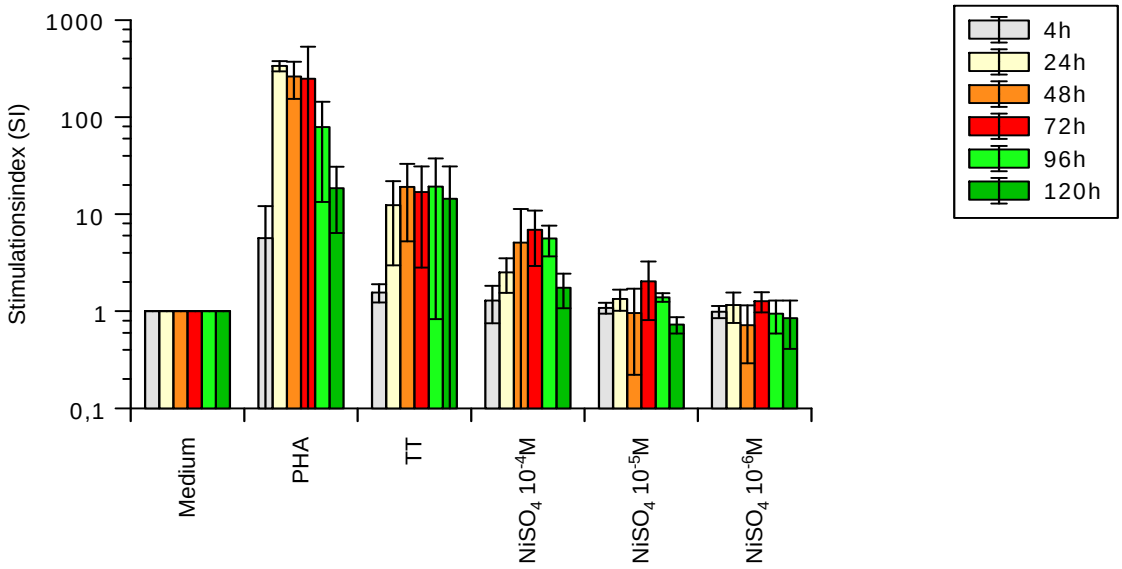


Abb. 16b

Abb. 16: Proliferation der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (a) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (b) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zusatz 10% humanes AB-Serum); angegeben ist jeweils der Mittelwert des SI

4.4.2 Zusammenfassender Vergleich der Proliferation unter Zusatz von 1% und 10% AB-Serum

In Abb. 17 erkennt man eine ähnlich ausgeprägte Proliferationsantwort der PBMC von Nickel-allergischen Blutspendern und nicht-allergischen Kontrollpersonen nach der Stimulation mit PHA. Die Proliferation nimmt als Ausdruck der Pan-T-Zell Stimulation durch PHA rasch zu, sinkt aber auch wieder in Entsprechung zu den „unphysiologischen“ Stimulationsbedingungen in beiden Blutspendergruppen. Das Proliferationsmaximum ist unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum bereits nach 24h erreicht, unter Zusatz von 1% humanem AB-Serum erst nach 96h. Die Proliferation nach PHA-Stimulation war erwartungsgemäß in beiden Blutspendergruppen und unter beiden AB-Serum-Zusätzen (1% und 10%) stark erhöht.

Allgemein ließ sich feststellen, daß die Reaktivität der PBMC innerhalb der Nickel-allergischen Blutspender sowie der nicht-allergischen Kontrollpersonen deutliche interindividuelle Schwankungen aufweist. Bei der geringen Anzahl der Blutspender (10 Nickel-Allergiker, 5 Kontrollpersonen) ist somit zwangsläufig eine Werte-Streuung zu erwarten. Dementsprechend sind in den folgenden Abbildungen zur besseren Anschaulichkeit Mediane und nicht die Mittelwerte angegeben.

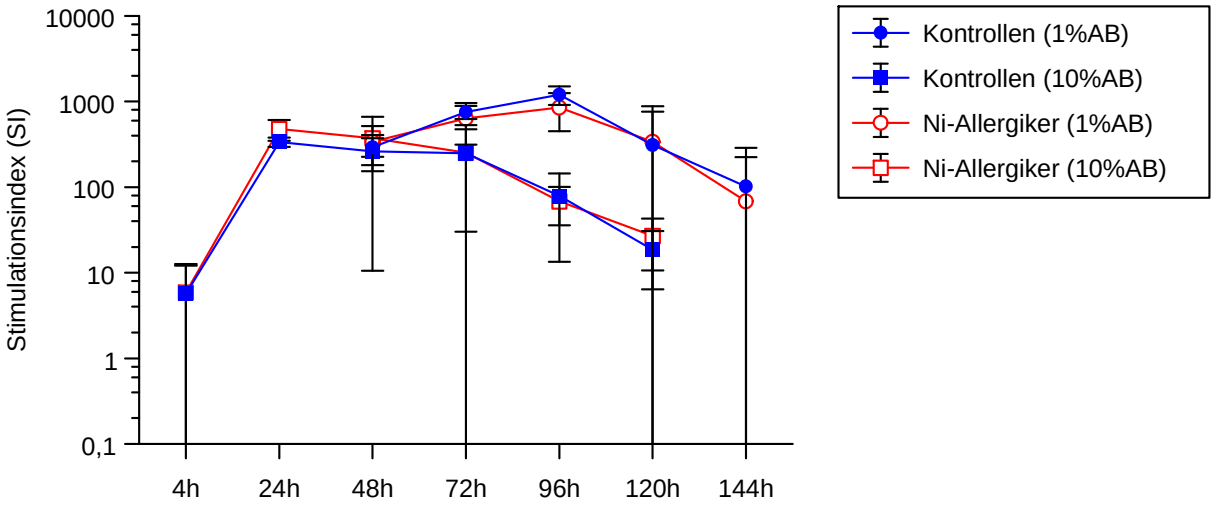


Abb. 17: Proliferation der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen während PHA-Stimulation unter Zusatz von 1% oder 10% humanem AB-Serum; angegeben sind Mediane (□, ■, ○, ● = Medianwerte)

Die Zellproliferation der PBMC nahm während der Stimulation mit Tetanus Toxoid über den gesamten Beobachtungszeitraum zu (Abb. 18), sowohl bei den Nickel-allergischen Blutspendern als auch bei den nicht-allergischen Kontrollpersonen. Unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum erreichte die Proliferation allerdings höhere Werte als unter Zusatz von 1% humanem AB-Serum (Median-SI 50,5 vs 14,37). Die Proliferationserhöhung war in beiden Blutspendergruppen und unter beiden AB-Serum-Zusätzen (1% und 10%) gegenüber der Ausgangslage (SI = 1) am Ende der Stimulationsdauer signifikant erhöht ($p < 0,5$). Auch im Vergleich zu den Werten nach 48h nahm die Proliferation in beiden Gruppen nochmals bis zur 144h-Messung signifikant zu ($p < 0,05$). Hier lagen allerdings nur Vergleichswerte für Kultur mit 1% AB-Serum enthaltendem Medium vor.

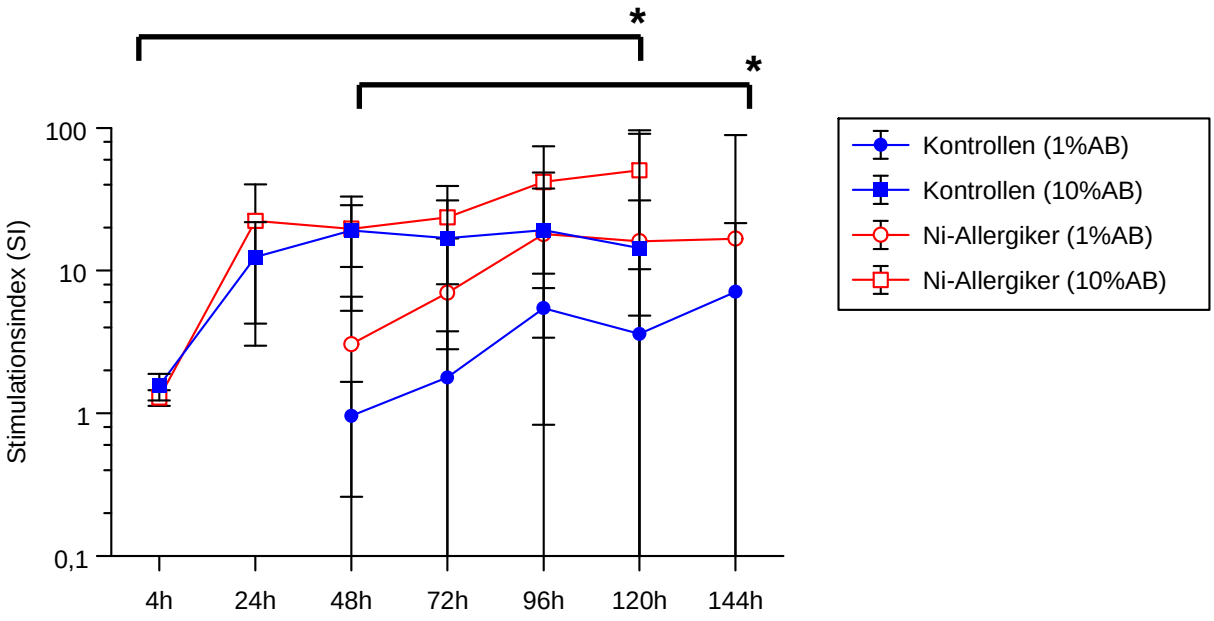


Abb. 18: Proliferation der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen während TT-Stimulation unter Zusatz von 1% oder 10% humanem AB-Serum; angegeben sind Mediane (□, ■, ○, ● = Medianwerte); * = $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummentest)

Die Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M führte in Abhängigkeit von Medium mit 1% oder 10% AB-Serum zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 19a). Zwar war bei 1% AB-Serum-Zusatz die Proliferation der PBMC Nickel-allergischer Blutspender gegenüber denen der nicht-allergischen Kontrollpersonen erhöht, aber erst bei Zusatz von 10% AB-Serum wurden diese Unterschiede signifikant sichtbar ($p < 0,5$). Der Median-SI der Nickel-allergischen Blutspender betrug dabei als Maximum nach 120h Stimulation 27,86 gegenüber einem SI von 1,75 bei den PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen. Unter Zusatz von 1% AB-Serum zeigt sich in Abb. 30a bei den PBMC der nicht-allergischen Blutspender die bereits in 4.1 beschriebene Vitalitätsbeeinträchtigung unter hoher Nickelexposition.

Bei der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-5}M traten die Unterschiede noch deutlicher auf (Abb. 19b). Während mit Zusatz von 1% AB-Serum die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender und die der nicht-allergischen Kontrollpersonen keine Proliferation im Vergleich zum Leerwert zeigten, proliferierten die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender im Stimulationsansatz mit Zusatz von 10% AB-Serum deutlich im Vergleich zu den PBMC der nicht-allergischen Blutspender (maximaler SI 17,99; $p < 0,05$).

In Abb. 19c ist die Proliferation der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender und der nicht-allergischen Kontrollpersonen während der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-6}M dargestellt. Die Ergebnisse aus Abb. 30a und 30b werden auch hier bestätigt. Mit Zusatz von 1% AB-Serum lassen sich die PBMC praktisch nicht zur Proliferation stimulieren. Andererseits zeigt sich, daß die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender mit Zusatz von 10% AB-Serum auch während einer Stimulation mit der geringen Konzentration von 10^{-6}M noch eine leicht erhöhte Proliferation im Vergleich zu den PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen zeigten (2,61 vs 0,85). Dieser Unterschied war nicht signifikant.

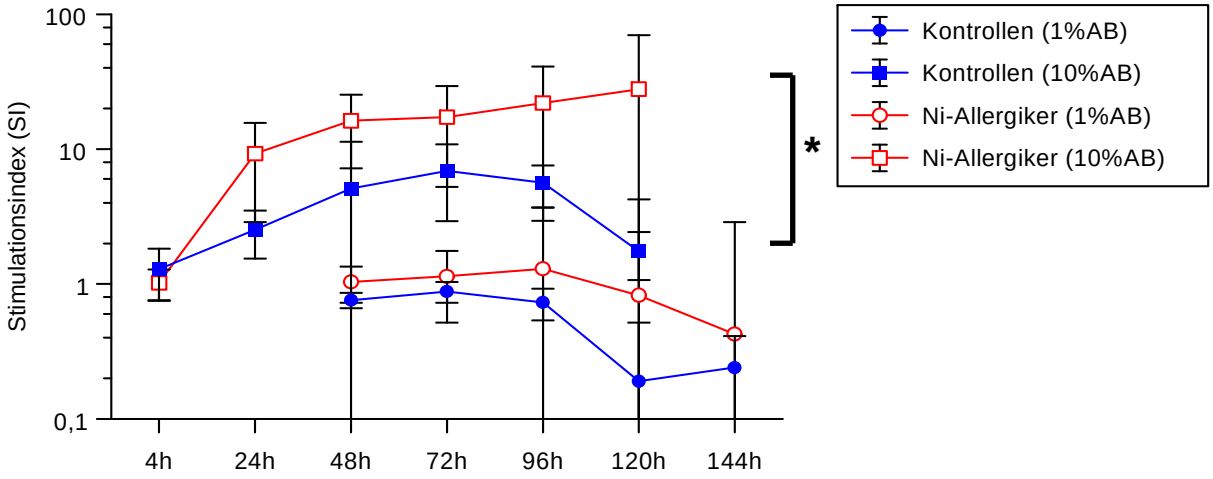


Abb. 19a

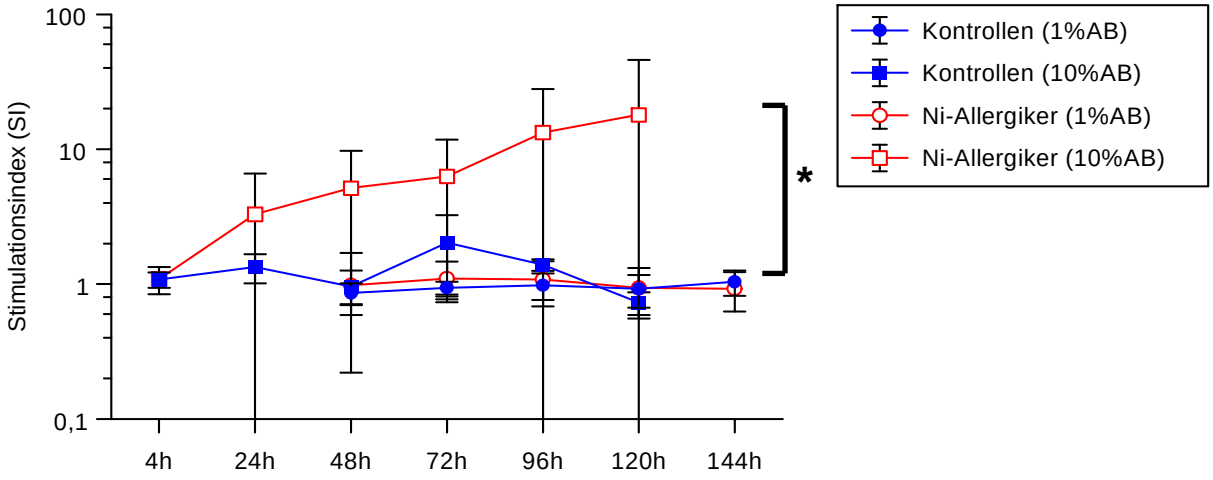


Abb. 19b

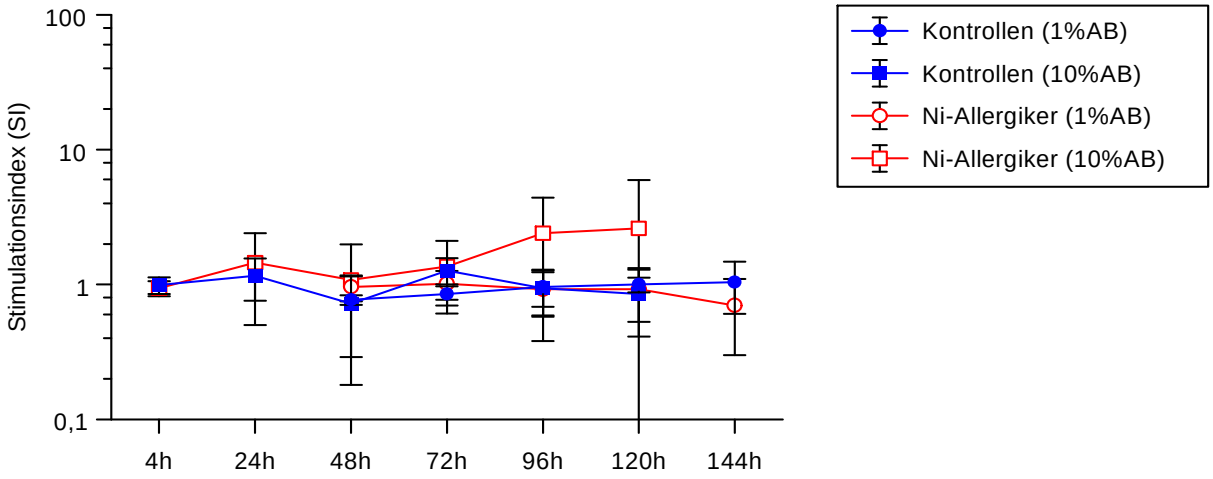


Abb. 19c

Abb. 19: Proliferation der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen während der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M (a), $NiSO_4$ 10^{-5}M (b) und $NiSO_4$ 10^{-6}M (c) unter Zusatz von 1% oder 10% humanem AB-Serum; angegeben sind die Mediane (□, ■, ○, ● = Medianwerte); * = $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummentest)

4.4.3 IFNγ-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium

Unter den verbesserten Zellkulturbedingungen (10% AB-Serum) wurde zusätzlich die Produktion von IFNγ, IL4 und IL12p70 im Überstand der Zellkulturen mittels ELISA bestimmt. PHA führte in beiden Blutspendergruppen zu deutlich höheren IFNγ-Spiegeln als in der unstimulierten Kultur (Abb. 20a und 20b). Der Wert war bereits nach 4 stündiger Kultur leicht erhöht und stieg anschließend rasch weiter bis auf maximal 80ng/ml. Tetanus Toxoid führte zu einem langsameren Anstieg der IFNγ-Produktion. Höchste Werte (4,959ng/ml) lagen nach 144h-Kultur vor. $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) führte mit Ausnahme vereinzelter Blutspender zu keiner deutlichen IFNγ-Produktion.

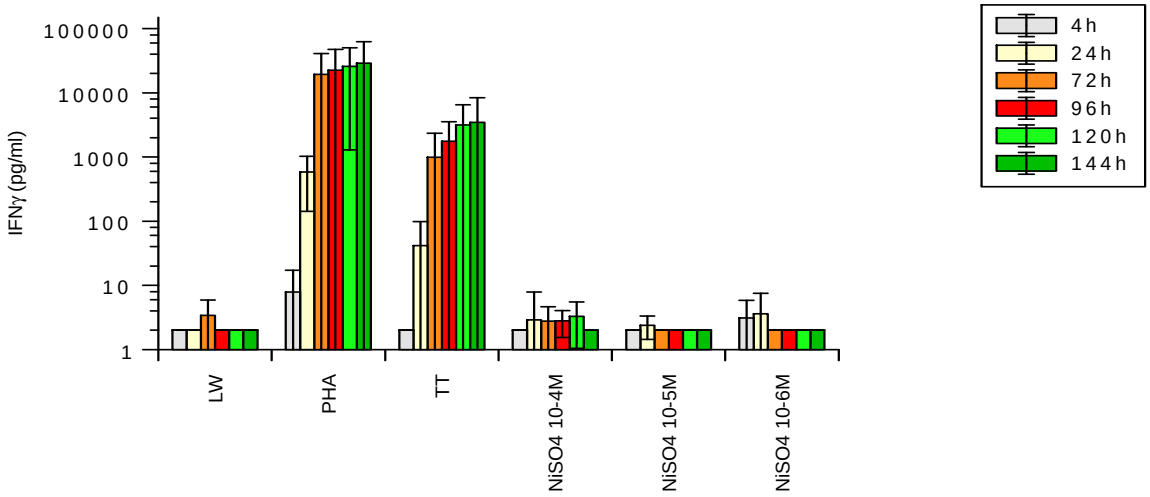


Abb. 20a

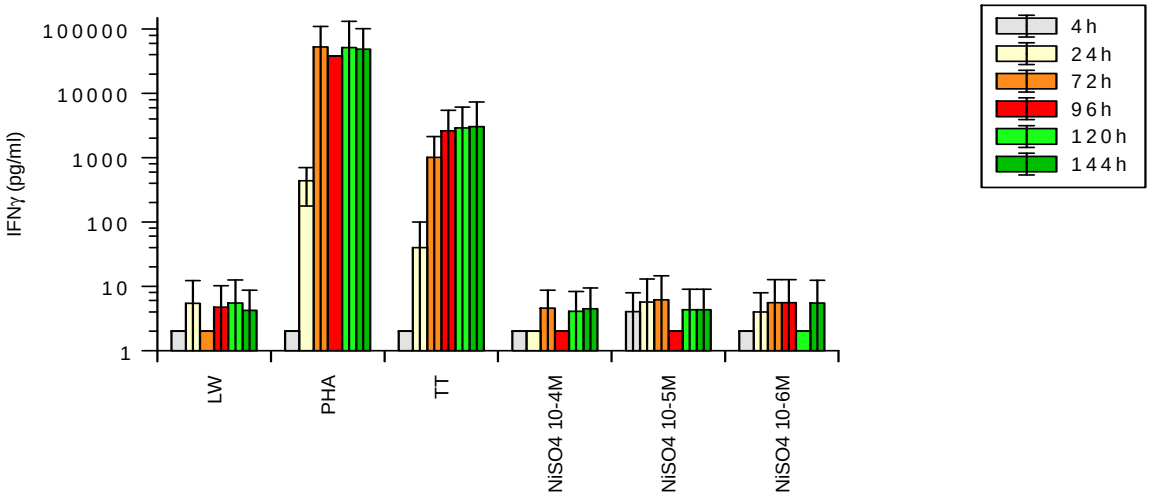


Abb. 20b

Abb. 20: IFNγ-Produktion der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (a) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (b) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zusatz von 10% humanem AB-Serum); angegeben ist der Mittelwert; Detektionslimit 2pg/ml;

4.4.4 IL4-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium

Nur PHA und Tetanus Toxoid induzierten IL4-Anstiege in der Zellkultur. Wie Abb. 21a und 21b zeigen, führte PHA zu einem raschen, passageren Anstieg der IL4-Produktion in beiden Blutspendergruppen (Maximum nach 24h 90,34pg/ml). Unter Tetanus Toxoid stiegen die IL4-Spiegel langsam an, wobei hier die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender größere Mengen produzierten (21,89pg/ml vs 13,89pg/ml). In den ersten 24 Stunden der Nickelstimulation (10^{-4}M) produzierten die PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen vergleichsweise mehr IL4. Anschließend lag die IL4-Produktion der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender unter $NiSO_4$ höher. Allerdings waren die IL4-Werte während der Stimulation mit $NiSO_4$ nahe am Detektionslimit, so daß man hier nur Tendenzen angeben kann.

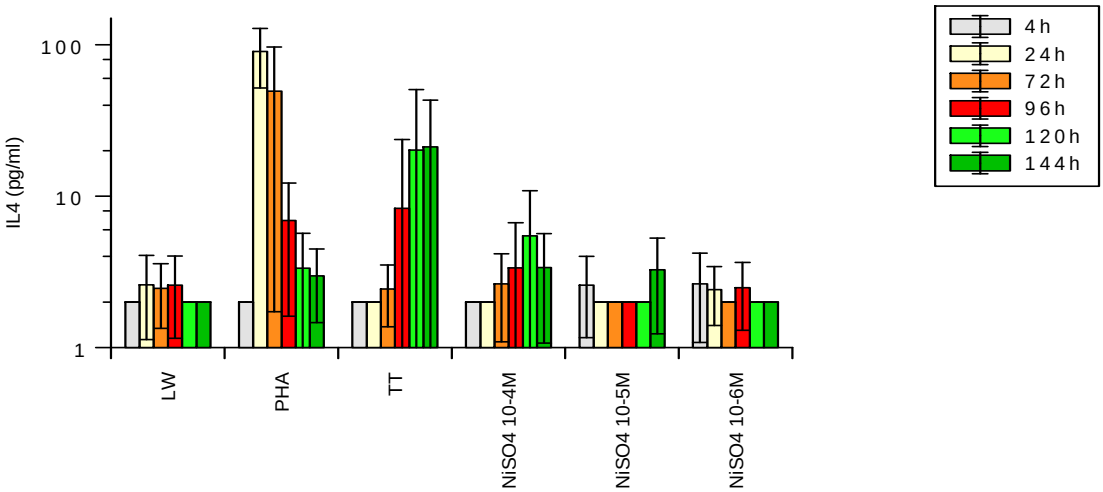


Abb. 21a

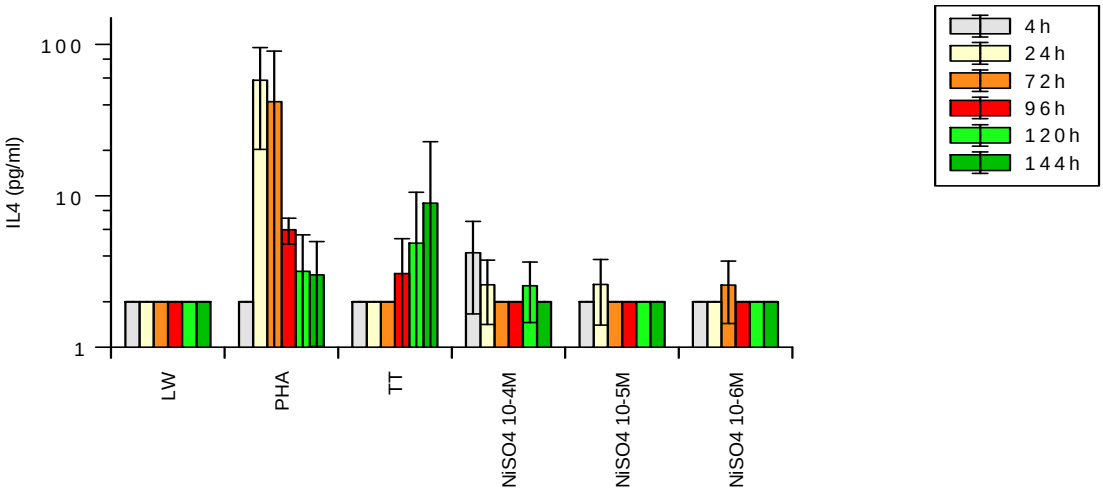


Abb. 21b

Abb. 21: IL4-Produktion der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (a) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (b) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zusatz von 10% humanem AB-Serum); angegeben sind die Mittelwerte; Detektionslimit 2pg/ml;

4.4.5 IL12p70-Produktion unter Zusatz von 10% AB-Serum im Kulturmedium

Abb. 22 zeigt die IL12p70-Produktion in vitro von PBMC der 10 Nickel-allergischen und der 5 nicht-allergischen Blutspender unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum. Die PHA-Stimulation führte in beiden Gruppen zu einer initialen und passageren gesteigerten IL12p70-Produktion. Sowohl die Stimulation mit Tetanus Toxoid, als auch die mit $NiSO_4$ hatten wenig Effekt auf die IL12p70-Produktion (tendenziell erhöht unter Nickel-Exposition bei Zellen der Nickel-allergischen Blutspender).

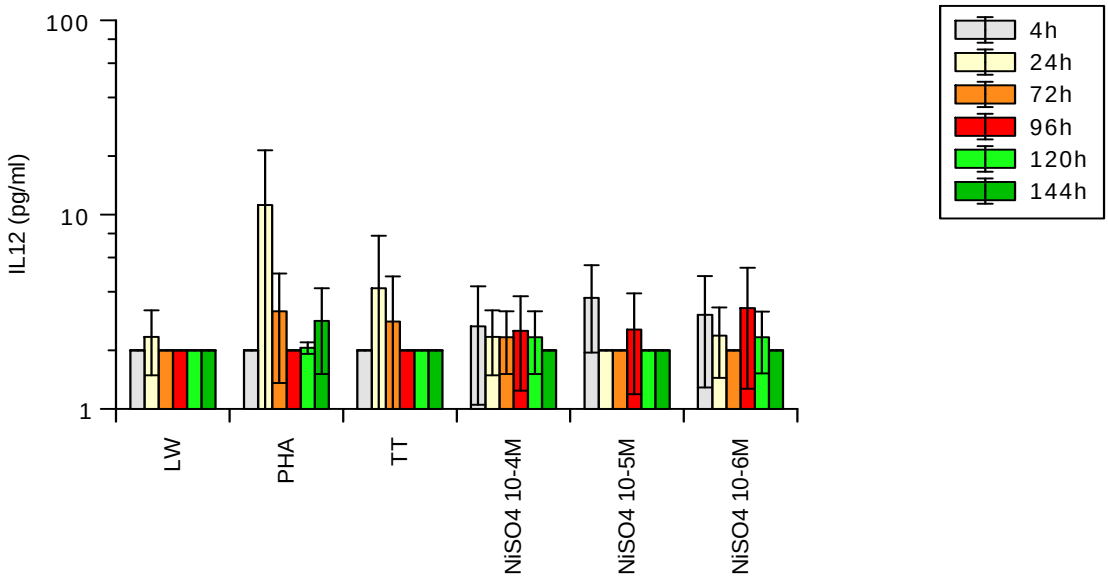


Abb. 22a

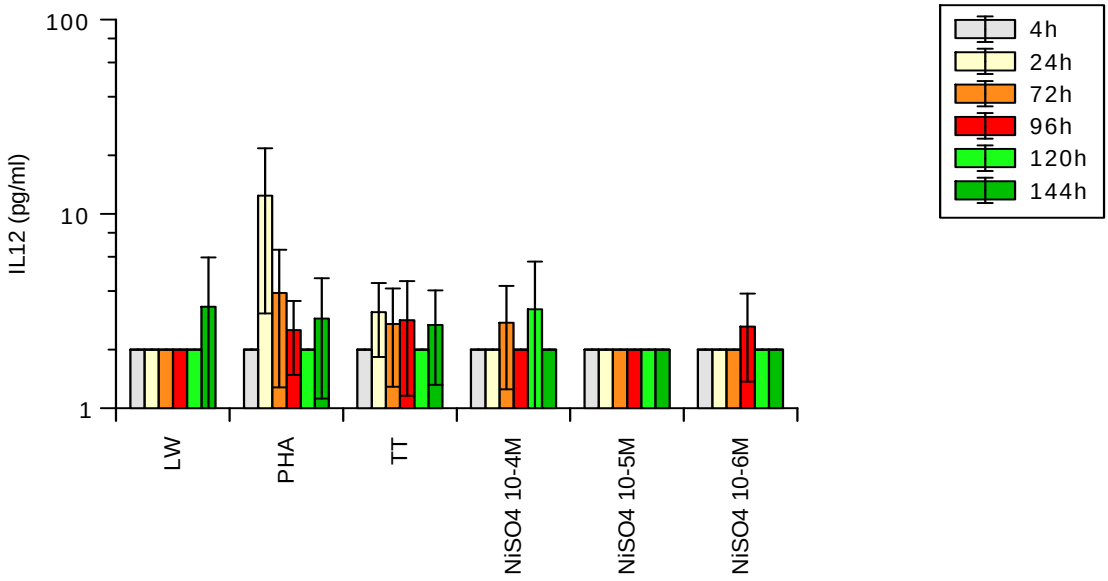


Abb. 22b

Abb. 22: IL12-Produktion der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (a) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (b) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ in drei verschiedenen Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zusatz von 10% humanem AB-Serum); angegeben sind die Mittelwerte; Detektionslimit 2pg/ml;

4.5 Oligoklonalität in PBMC Nickel-allergischer Blutspender nach In-vitro-Stimulation

Es wurden 10 Nickel-allergische Blutspender (8w, 2m, 21-60 Jahre; Epikutantestreaktion auf Nickel) sowie 5 nicht-allergische Kontroll-Blutspender untersucht (3w, 2m, 35-72 Jahre). Nachdem die PBMC aus dem venösen Blut über Ficoll-Dichtezentrifugation gereinigt waren, wurden sie über 6 Tage mit Medium als Kontrolle, Phytohämagglutinin (PHA), Tetanus Toxoid (TT) oder drei verschiedenen Nickel-Konzentrationen (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum stimuliert. Anschließend wurde über radioaktiven Thymidineinbau die Zellproliferation als Ausdruck für die Expansion der stimulierten Zellen bestimmt.

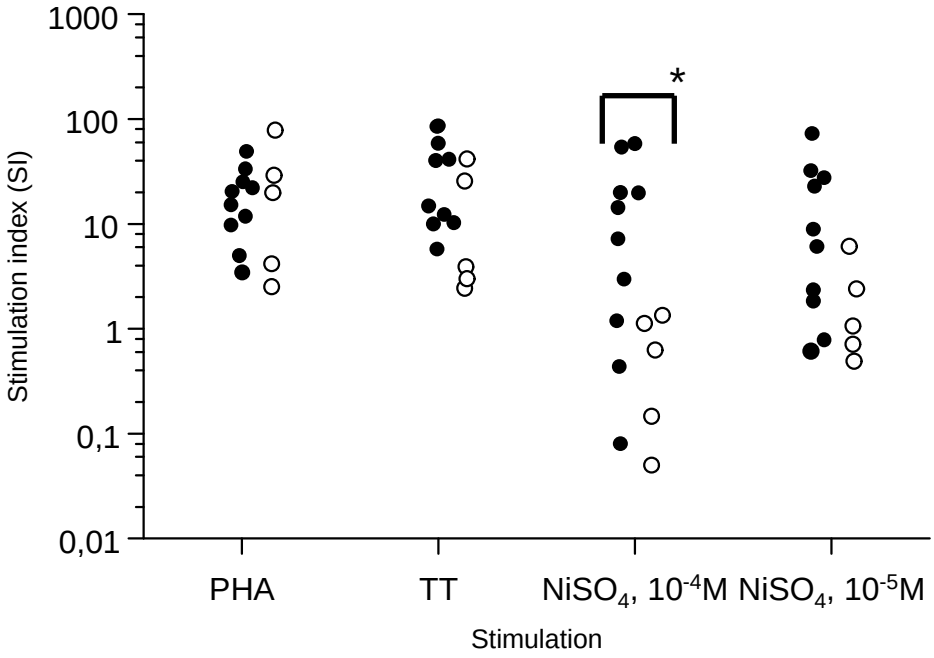


Abb. 23: Proliferation (als Stimulationsindex, SI, dargestellt) der PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern (•) und 5 nicht-allergischen Kontrollen (o) nach der 6-tägigen Stimulation mit PHA, TT oder $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M); * = $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummentest); Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

Es zeigte sich, daß die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender speziell auf die Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M hin signifikant mehr proliferierten als die PBMC der nicht-allergischen Kontrollpersonen (SI = 8,32 vs 0,86, Abb. 23). Weiterhin fällt auf, daß bei der höheren Nickelkonzentration (10^{-4}M), die Zellen der nicht-allergischen Blutspender meist einen SI < 1 zeigen. Dies weist auf das schon unter 4.1 beschriebene Phänomen der Vitalitätsbeeinträchtigung gegenüber höheren Nickelkonzentrationen hin.

In einem Parallelansatz wurde nach 6 Tagen die DNA aus den Zellen gewonnen und eine Klonalitätsanalyse durchgeführt. Die Klonalitätsanalyse anhand der TZRγ-Rearrangement-Beurteilung wurde mit Unterstützung von Herrn PD Dr. C. Sander an unserer Klinik etabliert und an unsere Versuchsbedingungen angepasst. Die Ergebnisse wurden von PD Dr. C. Sander zusätzlich begutachtet und bewertet.

In den Abb. 24-27 ist das Ergebnis einer Klonalitätsanalyse beispielhaft an Blutspender Nr. 9 (Nickel-allergischer Blutspender) gezeigt. Dabei zeigt Abb. 24 das Ergebnis der PCR mit den spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 2. Als Positivkontrolle dienten 2 Zellinien, die jeweils 2 TZRγ-Familien exprimieren (Zellinie Jurkat = Vγ2, Vγ11; Zellinie HSB2 = Vγ9, Vγ10). Im Fall von Vγ2 zeigt sich bei Blutspender 9 eine schwache Bande im Leerwert (Stimulation mit Medium alleine), sowie nach der Stimulation mit Tetanus Toxoid und deutlicher nach der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M (s. Pfeil). In Absprache mit PD Dr. C. Sander ist nur die Bande für $NiSO_4$ 10^{-4}M, sowie für Tetanus Toxoid signifikant und wurde als positiv bewertet.

TZRγ-Familie 2:

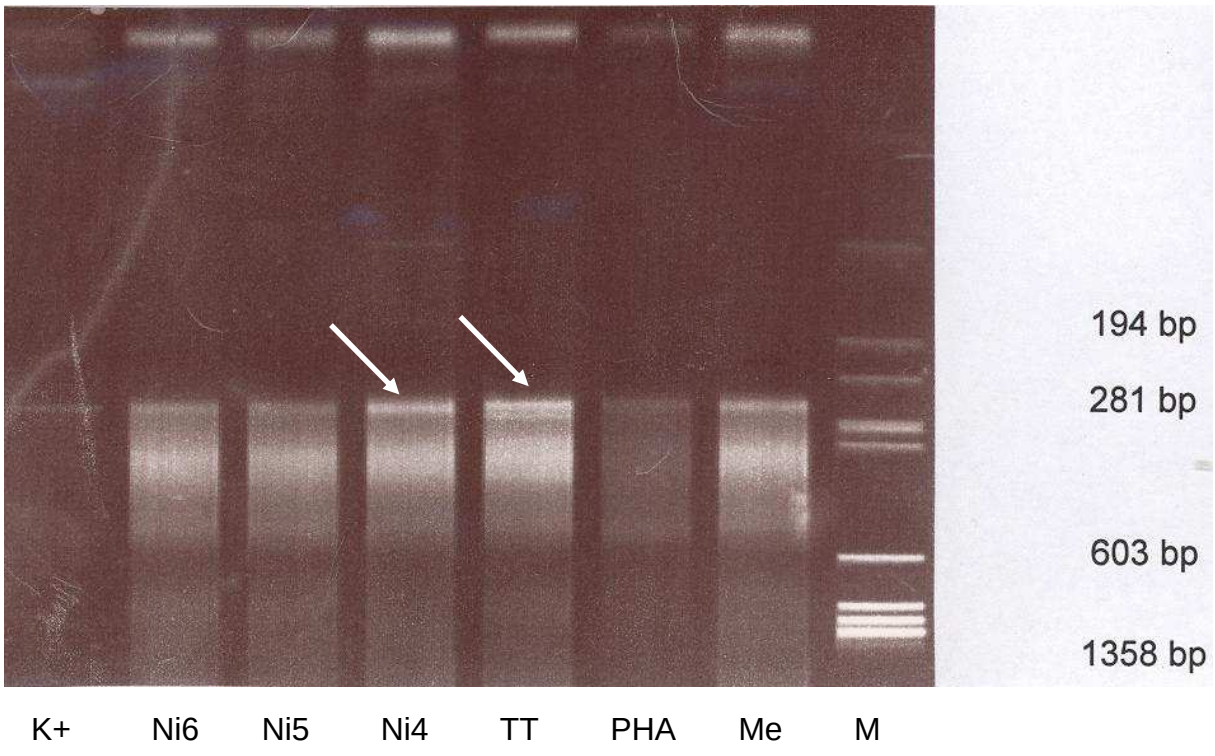


Abb. 24: Klonalitätsanalyse der PBMC eines Nickel-allergischen Blutspenders nach 6 Tagen Kultur: M = DNA-Standard (ΦX-174, HaeIII Digest), Me = Stimulation mit Medium, PHA = Stimulation mit PHA, TT = Stimulation mit Tetanus Toxoid; Ni4, Ni5, Ni6 = Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M, 10^{-5}M und 10^{-6}M;

Abb. 25 zeigt für Blutspender Nr. 9 das Gelbild nach der PCR mit den spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 9 (Vγ9). Auch hier zeigen sich schwache Banden bei allen Stimulationsansätzen sowie beim Leerwert. Diese Banden wurden ebenfalls als negativ eingestuft. Die Bandenstärke differiert in den einzelnen Ansätzen leicht und ist ein Ausdruck für die unterschiedliche Zellzahl, die in den einzelnen Ansätzen nach 6 Tagen Stimulationskultur vorhanden war, da auch eine Vielzahl der Zellen während der Stimulation absterben.

TZRγ-Familie 9:

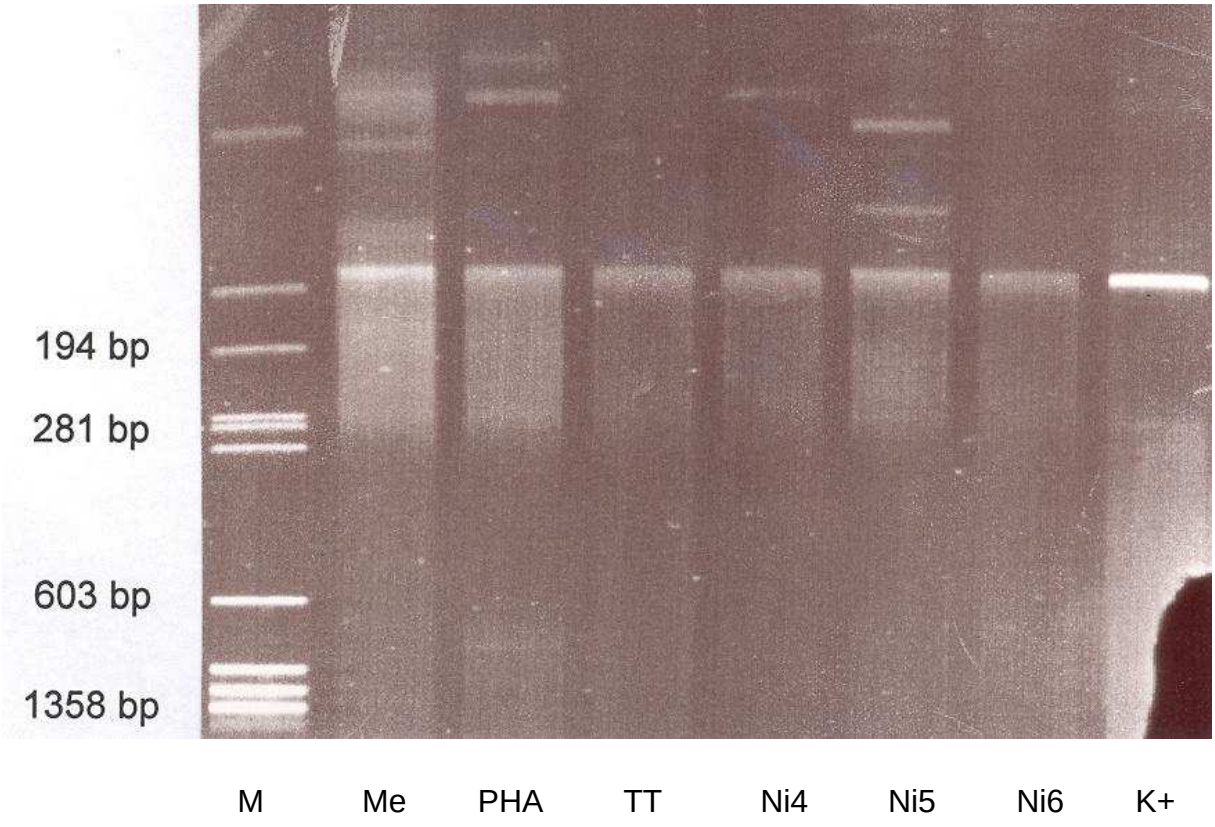


Abb. 25: Klonalitätsanalyse der PBMC eines Nickel-allergischen Blutspenders nach 6 Tagen Kultur: M = DNA-Standard (ΦX-174, HaeIII Digest), Me = Stimulation mit Medium, PHA = Stimulation mit PHA, TT = Stimulation mit Tetanus Toxoid; Ni4, Ni5, Ni6 = Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M, 10^{-5}M und 10^{-6}M;

Die PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 10 zeigte nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel eine deutliche Bande im Leerwert, sowie nach der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-5}M (Abb. 26). Diese beiden Banden wurden als positiv eingestuft. Wegen der auch im Leerwert vorhandenen positiven Bande wurde der Blutspender nochmals genauer zu seinem Gesundheitszustand befragt. Es zeigte sich, daß er kürzlich einen (zum Zeitpunkt der Blutentnahme abklingenden) Infekt durchgemacht hatte. So beruht die positive Bande im Leerwert vermutlich auf diesem Infekt. Da dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte, wurden die Blutspender für die folgenden Versuche noch genauer befragt bzw. bei Infekthinweis oder aktueller sonstiger Erkrankung ausgeschlossen.

TZRγ-Familie 10:

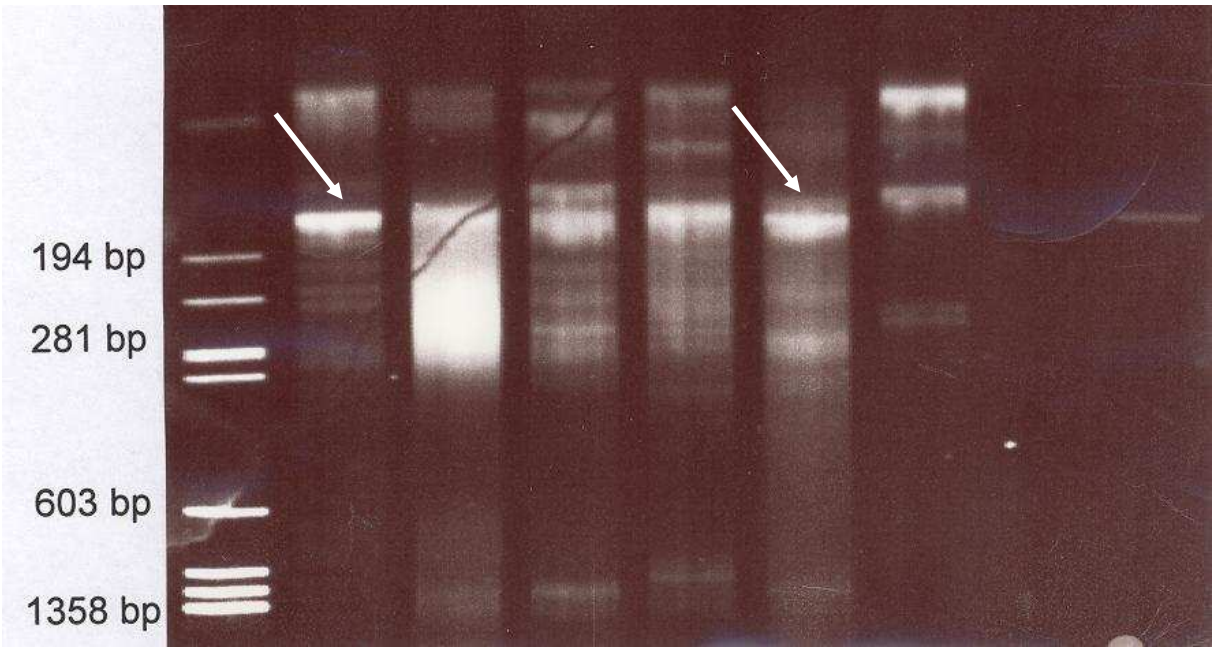


Abb. 26: Klonalitätsanalyse der PBMC eines Nickel-allergischen Blutspenders nach 6 Tagen Kultur: M = DNA-Standard (ΦX-174, HaeIII Digest), Me = Stimulation mit Medium, PHA = Stimulation mit PHA, TT = Stimulation mit Tetanus Toxoid; Ni4, Ni5, Ni6 = Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M, 10^{-5}M und 10^{-6}M;

Die Klonalitätsanalyse der PBMC des Blutspenders Nr. 9 zeigte nach der PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 11 (Vγ11) eine deutliche Bande für die Probe nach der Stimulation mit Tetanus Toxoid (Abb. 27). Dies bedeutete eine gut erkennbare Expansion einer kleinen Gruppe von T-Zellen nach Stimulation mit dem Antigen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten aus dem parallel durchgeführten LTT (Abb. 23), die auch eine deutliche Proliferation der Lymphozyten beider Blutspendergruppen aufgrund der Tetanus Toxoid-Stimulation zeigten.

TZRγ-Familie 11:

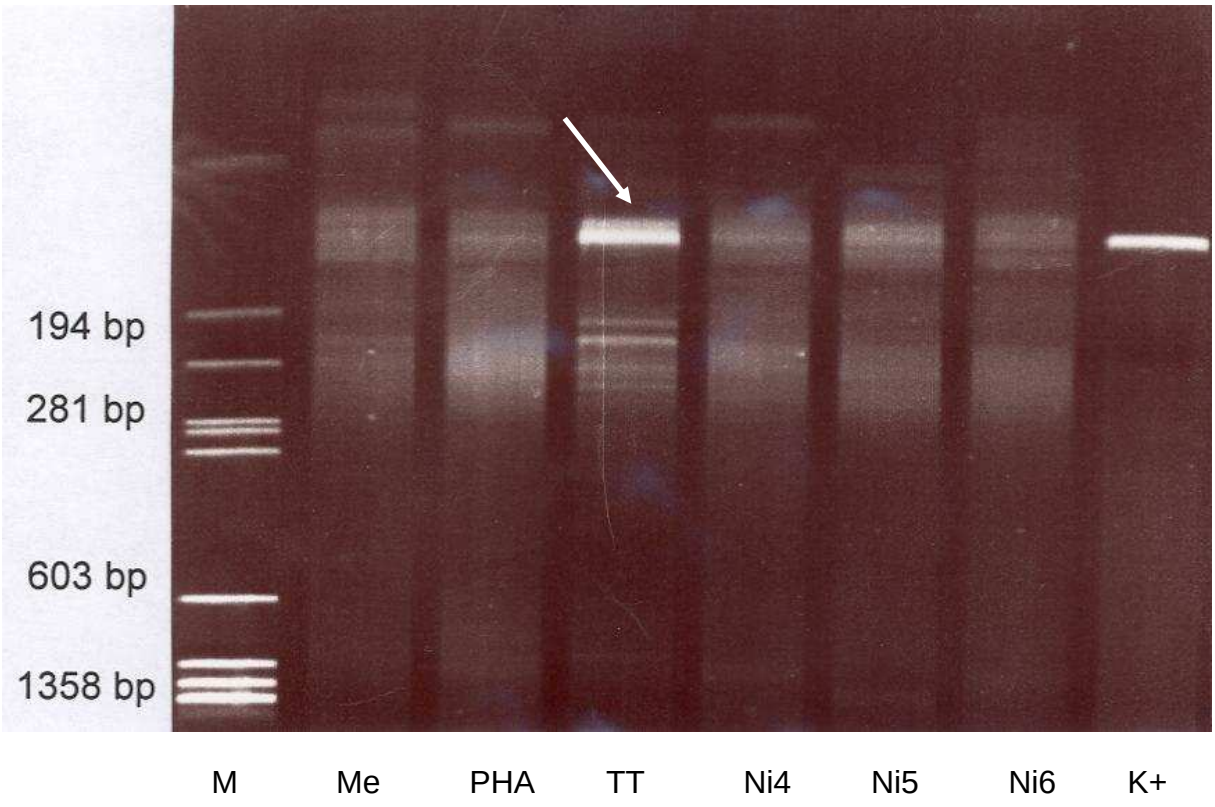


Abb. 27: Klonalitätsanalyse der PBMC eines Nickel-allergischen Blutspenders nach 6 Tagen Kultur: M = DNA-Standard (ΦX-174, HaeIII Digest), Me = Stimulation mit Medium, PHA = Stimulation mit PHA, TT = Stimulation mit Tetanus Toxoid; Ni4, Ni5, Ni6 = Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-4}M, 10^{-5}M und 10^{-6}M;

In der folgenden Tabelle sind die Untersuchungsergebnisse der Klonalitätsanalyse der 15 Blutspender zusammengefasst.

Patienten		Medium	PHA	TT	$NiSO_4$ 10^{-4}M	$NiSO_4$ 10^{-5}M	$NiSO_4$ 10^{-6}M
Ni-Allergiker	1	-	-	Vγ11	-	-	Vγ2
	2	-	-	Vγ11	Vγ10	-	-
	3	-	-	Vγ11	Vγ10	Vγ10	-
	4	-	-	Vγ9	Vγ9	Vγ9	-
	5	-	-	Vγ11	Vγ2, Vγ11	-	Vγ10
	6	Vγ9	Vγ9	Vγ9	Vγ9	Vγ9	Vγ9
	7	-	-	-	Vγ10	-	Vγ11
	8	-	-	Vγ11	Vγ10	Vγ10	-
	9	Vγ10	-	Vγ11	Vγ2	Vγ10	-
	10	-	-	Vγ9	Vγ2	Vγ2	Vγ2
Kontrollen	11	-	-	Vγ11	-	Vγ11	Vγ11
	12	-	-	Vγ9	Vγ2, Vγ9	Vγ9	Vγ9
	13	-	-	Vγ9	-	-	Vγ10
	14	Vγ10	Vγ2	Vγ10	Vγ2	-	Vγ11
	15	-	-	-	Vγ11	Vγ10	Vγ9

Tabelle 4: Klonalitätsanalyse von in-vitro stimulierten PBMC von 10 Nickel-allergischen Blutspendern und 5 nicht-allergischen Kontrollen; angegeben ist die TZRγ-Familie, die nach 6 Tagen Stimulation nach der PCR auf dem Polyacrylamidgel eine deutlich positive Bande gab

Die Daten aus Tabelle 4 zeigen deutlich, daß in der Regel weder im Leerwert (Kultur mit Medium alleine), noch nach der Stimulation mit PHA vermehrt eine Zellpopulation mit vorherrschender TZRγ-Familie auftritt. Ausnahmen sind bei den Nickel-allergischen Blutspendern die Nr. 6 und 9 und bei den nicht-allergischen Kontrollpersonen der Blutspender 14. Bei der Blutabnahme gaben alle Blutspender an, keine derzeitige Erkrankung zu haben. Auf Tetanus Toxoid als typischem „Recall"-Antigen reagierten fast alle Blutspender mit der Proliferation einer Zellpopulation, die vermehrt einer bestimmten TZRγ-Familie angehört. Dabei traten 3 verschiedene TZRγ-Familien auf (Vγ9, Vγ10, Vγ11). Bei der Stimulation mit $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) traten sowohl bei den nicht-allergischen Kontrollpersonen als auch bei Nickel-allergischen Blutspendern verschiedene TZRγ-Familien als Ergebnis einer T-Zellproliferation auf. Es fällt auf, daß bei den Kontrollpersonen die TZR-Verteilung auch innerhalb eines Blutspenders bei den verschiedenen Nickelkonzentrationen variiert. Bei den Nickel-allergischen Blutspendern dagegen

blieb bei den einzelnen Personen die TZRγ-Familie über die einzelnen Nickel-Stimulationen hinweg weitgehend konstant.

4.6 Kinetik der T-Zellreaktion in vitro

In einer Folgeserie wurden PBMC von 10 Nickel-allergischen und 5 nicht-allergischen Kontroll-Blutspendern isoliert und über 5 Tage mit Medium, PHA, TT und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) stimuliert. Es erfolgte jeweils eine Analyse nach 48h (Tabelle 5), 96h (Tabelle 6) und 144h (Tabelle 7). Dabei wurde zum einen eine Klonalitätsanalyse des TZRγ durchgeführt, zum anderen eine RT-PCR mit spezifischen Primern für IFNγ und IL4. Zuvor wurde als Kontrolle eine RT-PCR mit spezifischen Primern für das Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH), sowie für das β-actin-Gen durchgeführt. Diese „house keeping genes“ werden in allen Zellen konstitutiv exprimiert und dienten als Kontrolle, um zu sehen, ob amplifizierbare cDNA vorhanden ist. Dabei zeigte sich, daß die IFNγ-Expression während einer PHA-Stimulation sehr rasch und deutlich zunahm, sowohl bei den Nickel-allergischen wie auch bei den nicht-allergischen Kontroll-Blutspendern. Die IFNγ-Expression nahm auch während einer Nickel-Stimulation bei den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender zu. IL4 wurde dagegen kaum exprimiert. Nickel-stimulierte PBMC der nicht-allergischen Kontrollen zeigten kaum Zytokin-Expression, weder von IFNγ, noch von IL4. Während der TT-Stimulation stieg die IFNγ-Expression dagegen bei den PBMC der Nickel-allergischen und der nicht-allergischen Kontroll-Blutspendern langsamer an, als während der Nickel-Stimulation.

Während sich durch die PHA-Stimulation nur vereinzelt Oligoklonalität zeigte, führte die Stimulation mit TT bei allen Blutspendern - Nickel-allergischen und nicht-allergischen - zu einem oligoklonalen Muster. Bei der Nickelstimulation trat bei allen Nickel-allergischen, allerdings auch bei 2 Kontroll-Blutspendern ein oligoklonales TZRγ-Muster auf. Bei zwei Nickel-allergischen Blutspendern zeigten sich nach 48h Kultur innerhalb der verschiedenen Nickel-Konzentrationen verschiedene TZRγ-Familien, bei der 96h- und 144h-Kultur traten aber dann innerhalb der verschiedenen Nickel-Konzentrationen einheitliche TZRγ-Familien auf.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse und die IL4- und IFNγ-Expression (mittels RT-PCR) nach 48h Stimulationskultur zusammengefasst.

	48h	LW			PHA			TT			$NiSO_4$ 10^{-4}M			$NiSO_4$ 10^{-5}M			$NiSO_4$ 10^{-6}M		
	Patient	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4
Kontrollen	PS	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	PT	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	BS	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	MR	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	Vγ10	++	-	Vγ10	++	+	Vγ10	++	-
	PIA	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ10	-	-	Vγ10	-	-	Vγ10	-	-
Nickel-Allergiker	MA	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	++	-	Vγ10	+++	-	-	+++	-	-	+++	-
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	-	-	Vγ2,Vγ9	+++	-	Vγ2,Vγ9	+++	-	Vγ2,Vγ9	+++	+
	EW	-	-	-	-	+++	+	Vγ9	+	-	Vγ11	++	-	Vγ11	++	-	Vγ11	+++	-
	EZ	Vγ10	-	-	Vγ10	+++	-	-	+	-	Vγ2	+	-	Vγ2	+	-	Vγ2	+++	-
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ2	+++	-	Vγ2	+++	-	Vγ11	+++	-
	TW	-	+	-	-	+++	-	Vγ11	++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	+	Vγ11	+++	-
	DW	-	-	-	-	+++	+	Vγ11	-	-	Vγ9	+++	-	Vγ2	+++	-	Vγ2	+	-
	RB	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	+
	GB	-	+	-	Vγ2	+++	-	-	+	-	Vγ2,Vγ9	++	-	Vγ2,Vγ9	++	-	Vγ2,Vγ9	++	-
	AV	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ10	+++	-	Vγ10	+++	-	Vγ9	+++	-

Tabelle 5: Ergebnisse der Klonalitätsanalyse, sowie der RT-PCR nach Stimulation von PBMC von 15 Blutspendern (10 Nickel-Allergiker, 5 nicht-allergische Kontrollen) nach Stimulation mit Medium, PHA, TT und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) über 48h; Vγ2, 9, 10, 11 = entsprechende dominante Lymphozytenfamilie mit einer vorherrschenden TZRγ-Familie (2, 9, 10 oder 11); + = schwach exprimiert, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse und die IL4- und IFNγ-Expression (mittels RT-PCR) nach 96h Stimulationskultur zusammengefasst.

	96h	LW			PHA			TT			$NiSO_4$ 10^{-4}M			$NiSO_4$ 10^{-5}M			$NiSO_4$ 10^{-6}M		
	Patient	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4
Kontrollen	PS	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	PT	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	BS	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	MR	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	-	-	Vγ10	+	-	Vγ10	++	+	Vγ10	++	-
	PIA	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	-	-	Vγ9	-	-
Nickel-Allergiker	MA	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	Vγ11	+++	-	-	+++	-	-	+++	-
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	-	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	+
	EW	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	+	-	Vγ11	++	-	Vγ11	+	-	Vγ11	+++	-
	EZ	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	Vγ2	++	-	Vγ2	++	-	Vγ2	++	-
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	-	-	Vγ2	+++	-	Vγ2	+++	-	Vγ2	+++	-
	TW	-	+	-	Vγ9	+++	-	Vγ11	++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	+	Vγ11	++	-
	DW	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+	-
	RB	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	-	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	+
	GB	-	+	-	Vγ2	+++	+	-	+	-	Vγ2, Vγ9	++	-	Vγ2, Vγ9	++	-	Vγ2, Vγ9	++	-
	AV	-	-	-	-	+++	-	Vγ2	++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-

Tabelle 6: Ergebnisse der Klonalitätsanalyse, sowie der RT-PCR nach Stimulation von PBMC von 15 Blutspendern (10 Nickel-Allergiker, 5 nicht-allergische Kontrollen) nach Stimulation mit Medium, PHA, TT und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) über 96h; Vγ2, 9, 10, 11 = entsprechende dominante Lymphozytenfamilie mit einer vorherrschenden TZRγ-Familie (2, 9, 10 oder 11); + = schwach exprimiert, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse und die IL4- und IFNγ-Expression (mittels RT-PCR) nach 144h Stimulationskultur zusammengefasst.

	144h	LW			PHA			TT			$NiSO_4$ 10^{-4}M			$NiSO_4$ 10^{-5}M			$NiSO_4$ 10^{-6}M		
	Patient	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4	TZRγ-Familie	IFNγ	IL4
Kontrollen	PS	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	PT	-	-	-	-	+++	-	Vγ10	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-
	BS	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	MR	-	-	-	-	+++	-	Vγ2	+	-	Vγ10	+	-	Vγ10	++	+	Vγ10	+++	-
	PIA	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	-	-	Vγ9	-	-
Nickel-Allergiker	MA	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	-	-	Vγ10	+++	-	-	+++	-	-	+++	+
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	-	-	Vγ9	++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	+++	-
	EW	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	+	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-
	EZ	-	+	-	Vγ9	+++	-	-	-	-	Vγ2	++	-	Vγ2	++	-	Vγ2	++	-
	SB	-	-	-	-	+++	-	Vγ9	++	-	Vγ2,Vγ9	+++	-	Vγ2,Vγ9	+++	-	Vγ2,Vγ9	+++	-
	TW	-	+	-	-	+++	-	Vγ10	+	-	Vγ9	+++	-	Vγ11	+++	+	Vγ11	++	+
	DW	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	++	-	Vγ9	++	-	Vγ9	++	-	-	+	-
	RB	-	-	-	-	+++	-	Vγ11	-	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	-	Vγ9	+++	+
	GB	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	Vγ2,Vγ9	+++	-	Vγ2,Vγ9	++	-	Vγ2,Vγ9	++	+
	AV	-	-	-	-	+++	-	Vγ2	++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-	Vγ11	+++	-

Tabelle 7: Ergebnisse der Klonalitätsanalyse, sowie der RT-PCR nach Stimulation von PBMC von 15 Blutspendern (10 Nickel-Allergiker, 5 nicht-allergische Kontrollen) nach Stimulation mit Medium, PHA, TT und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) über 144h; Vγ2, 9, 10, 11 = entsprechende dominante Lymphozytenfamilie mit einer vorherrschenden TZRγ-Familie (2, 9, 10 oder 11); + = schwach exprimiert, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression

4.6.1 Klonalitätsanalyse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung grafisch dargestellt. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der einzelnen TZRγ-Familien bei den einzelnen Stimulationen. 100% entsprechen dabei allen Blutspendern, d.h. 10 bei den Nickel-allergischen und 5 bei den nicht-allergischen Blutspendern. Aufgeführt sind nur die Blutspender, die in der Klonalitätsanalyse nach Begutachtung der Gelbilder ein als positiv eingestuftes Signal zeigten. Nach 48h zeigt sich bereits ein deutlicher Unterschied (Abb. 28). Beim Leerwert (Mediumkultur) und nach der Stimulation mit PHA waren kaum spezifische Banden der entsprechenden TZRγ-Familien auf den einzelnen Polyacrylamidgelen zu sehen. Dies spricht für eine breite Verteilung bzw. polyklonale T-Zellexpansion. Nach der Stimulation mit $NiSO_4$ in den drei üblichen Konzentrationen ergaben sich Unterschiede zwischen Nickel-allergischen und nicht-allergischen Blutspendern. Während bei den Kontrollpersonen bei 40% ein Vγ10-Signal auftrat, zeigten 80-90% der Nickel-allergischen Blutspender nach der Nickel-Stimulation ein spezifisches Signal als Hinweis auf die Expansion von Subpopulationen. Dabei waren alle 4 verschiedenen TZRγ-Familien vertreten, bei 20% traten gleichzeitig Vγ2- und Vγ9-spezifische Banden auf. Auch die Stimulation mit Tetanus Toxoid führte bei beiden Blutspendergruppen zu spezifischen Banden für einzelne TZRγ-Familien, vermutlich als Zeichen für eine Antigen-induzierte spezifische T-Zell Expansion.

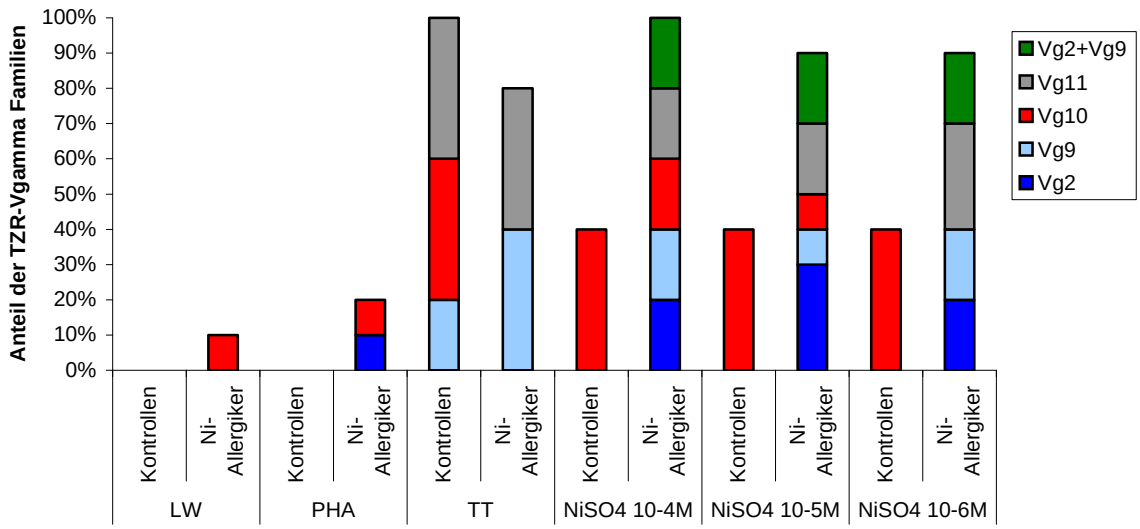


Abb. 28: Anteil der verschiedenen TZRγ-Familien (Messung nach 48h Kultur) nach Stimulation der PBMC von 10 Nickel-allergischen und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M); nur als positiv bewertete Banden sind angegeben

Abb. 29 zeigt die klonale Verteilung nach 96h Stimulation. Wiederum traten beim Leerwert, sowie nach der PHA-Stimulation keine deutlichen Banden auf, was für eine breite Verteilung bzw. polyklonale T-Zellexpansion spricht, ausgenommen bei je 10% der Nickel-allergischen Blutspender nach PHA-Stimulation. Die Nickel-Stimulation führte wiederum zu deutlichen Unterschieden. Nur 40% der Kontrollpersonen zeigten eine Bande nach der Stimulation mit $NiSO_4$ (Vγ9 und Vγ10). 80-90% der Nickel-allergischen Blutspender dagegen zeigten deutliche Banden nach der PCR mit den spezifischen Vγ-Primern. Dies zeigt eine spezifische Vermehrung von bestimmten T-Zell-Subpopulationen nach der Stimulation mit $NiSO_4$. Dabei waren die TZRγ-Familien 2, 9 und 11 vertreten, sowie bei 10% auch Vγ2 und Vγ9 gleichzeitig. Die TZRγ-Familien 2, 9, 10 und 11 sind nach der Stimulation mit Tetanus Toxoid in beiden Blutspendergruppen gleich verteilt. 100% der nicht-allergischen Kontroll-Blutspender, sowie 80% der Nickel-allergischen Blutspender zeigten nach der PCR spezifische Banden für die einzelnen Familien, was ein Zeichen für die spezifische Antigen-induzierte T-Zellexpansion darstellt.

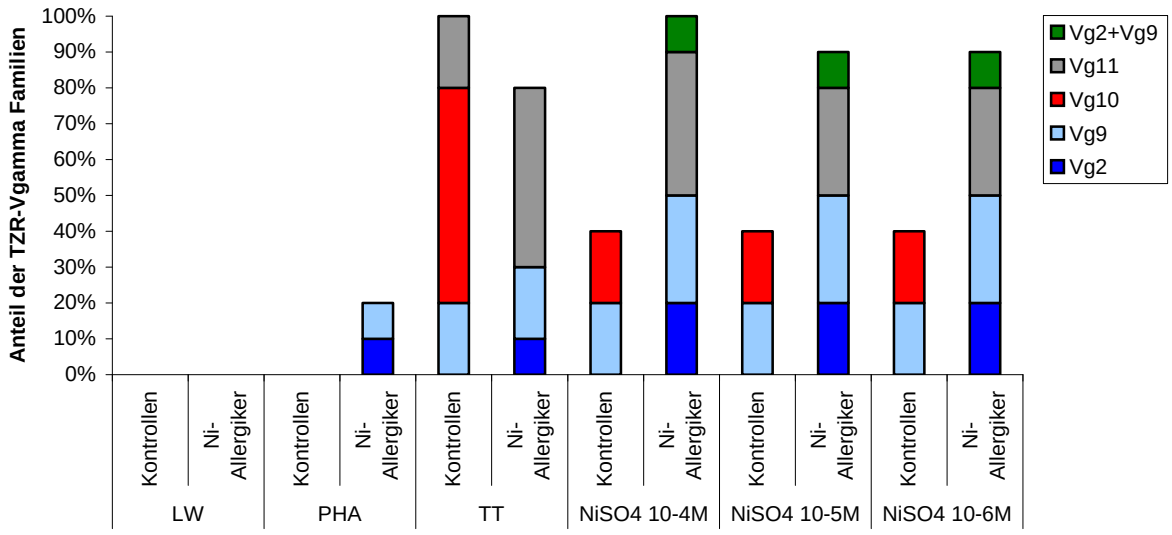


Abb. 29: Anteil der verschiedenen TZRγ-Familien (Messung nach 96h Kultur) nach Stimulation der PBMC von 10 Nickel-allergischen und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M); nur als positiv bewertete Banden sind angegeben

Die Ergebnisse nach 48h und 96h wurden durch die Ergebnisse nach 144h Kultur bestätigt (Abb. 30). Wiederum zeigten sich beim Leerwert sowie nach der PHA-Stimulation keine TZRγ-spezifischen Banden nach der PCR (nur 10% der Nickel-allergischen Blutspender zeigten nach Stimulation mit PHA eine spezifische Bande für Vγ2). Somit war in diesen beiden Ansätzen weiterhin vorwiegend eine polyklonale T-Zellpopulation vorherrschend. Die Stimulation mit Tetanus Toxoid führte bei 100% der Kontrollen sowie bei 80% der Nickel-allergischen Blutspender nach der PCR mit den spezifischen Primern zu positiven Banden für einzelne TZRγ-Familien und dadurch eine antigen-spezifische T-Zellexpansion. Das Verteilungsmuster der TZRγ-Familien nach der Nickel-Stimulation über 144h zeigte eine ähnliche Verteilung wie die vorangegangenen Stimulationskulturen. Nur 40% der nicht-allergischen Kontrollpersonen zeigten nach der $NiSO_4$-Stimulation klonale Banden, dagegen traten bei 70-100% der Nickel-allergischen Blutspender spezifische Banden für die einzelnen TZRγ-Familien auf. Es waren alle 4 verschiedenen TZR-Gruppen vertreten. Zusätzlich zeigten 20% der Nickel-allergischen Blutspender gleichzeitig die Banden für Vγ2 und Vγ9 nach der Stimulation mit $NiSO_4$. Diese Daten sprechen insgesamt für eine spezifische T-Zellexpansion bestimmter Subpopulationen nach der Stimulation der PBMC Nickel-allergischer Blutspender im Gegensatz zu den PBMC nicht-allergischer Kontrollpersonen.

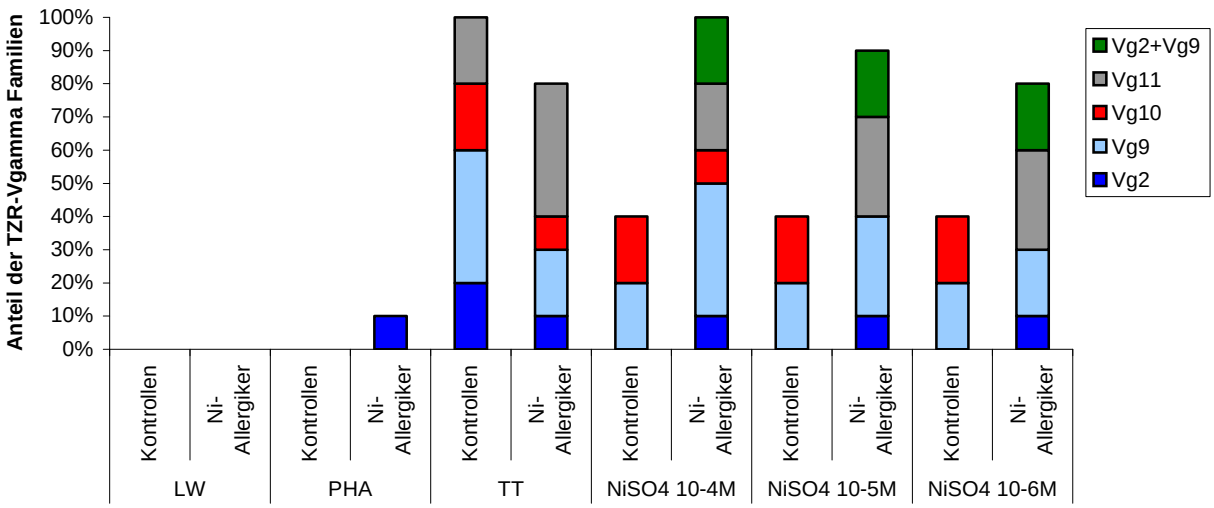


Abb. 30: Anteil der verschiedenen TZRγ-Familien (Messung nach 144h Kultur) nach Stimulation der PBMC von 10 Nickel-allergischen und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M); nur als positiv bewertete Banden sind angegeben

4.6.2 IL-4 und IFNγ-Expression in vitro (RT-PCR)

Im folgenden sind die Ergebnisse der RT-PCR mit IFNγ- und IL4-spezifischen Primern nach der Stimulation über 48h, 96h und 144h dargestellt. Angegeben sind jeweils die Prozentwerte, zu welchem Anteil die jeweiligen Expressionsstärken vertreten waren. Dabei bedeutet + eine schwache Bande, ++ eine mittlere Bande, sowie +++ eine deutliche Bande. Letzteres entspricht einer starken Expression des entsprechenden Gens. 100% entspricht der Gesamtzahl der Blutspender (10 Nickel-Allergiker und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen).

Abb. 31 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse nach 48h Stimulationsdauer. Während in der Leerwert-Kultur nur 20% der Nickel-allergischen Blutspender eine schwache Expression von IFNγ zeigten und IL4 überhaupt nicht exprimiert wurde, traten nach der PHA-Stimulation bei allen Blutspendern deutliche IFNγ-spezifische Banden auf. IL4 wurde wiederum kaum exprimiert. Die Tetanus Toxoid-Stimulation führte nur zu einer schwachen IFNγ-Expression. 70% der Nickel-allergischen Blutspender zeigten nach der $NiSO_4$-Stimulation eine deutliche IFNγ-Bande, 30% jeweils nur eine schwache Expression. Bei einzelnen Kontrollpersonen wurde IFNγ nach der Nickel-Stimulation nur schwach exprimiert.

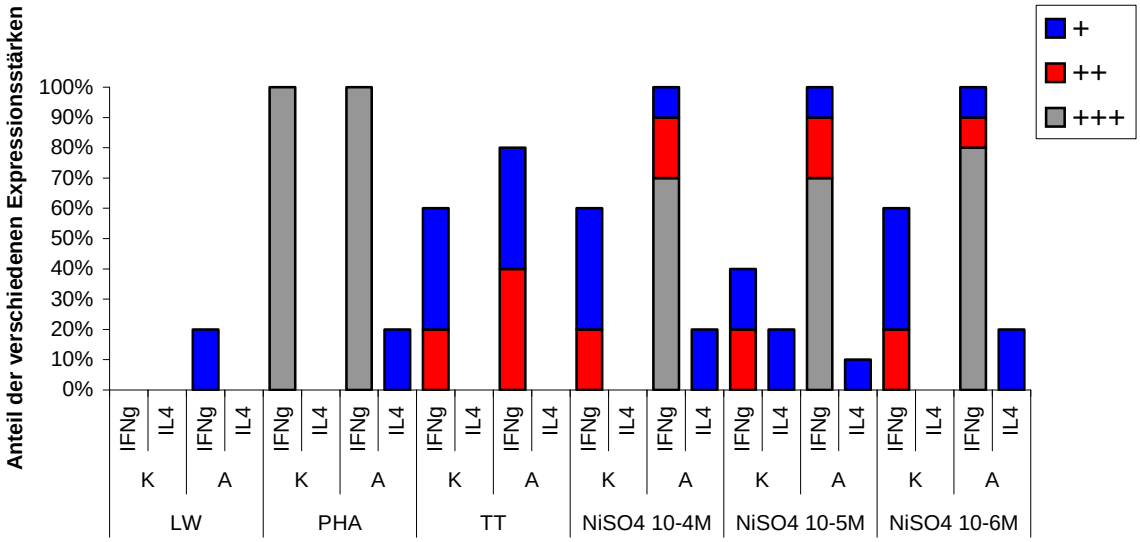


Abb. 31: RT-PCR mit IFNγ- und IL4-spezifischen Primern von PBMC von 10 Nickel-allergischen (A) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (K) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) nach 48h Stimulation; angegeben ist der jeweilige Anteil der verschiedenen Expressionsstärken (+++ = starke Expression, ++ = mittlere Expression, + = schwache Expression)

Nach 96h Stimulationsdauer zeigten sich ähnliche Expressionsmuster wie nach 48h Stimulationsdauer (Abb. 32). Während die PBMC der Blutspender in der unstimulierten Kultur kaum Expression zeigten (20% der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender exprimierten schwach IFNγ), traten nach der PHA-Stimulation bei Nickel-allergischen Blutspendern, sowie nicht-allergischen Kontrollpersonen starke IFNγ-Expressionen auf. Eine IL4-Expression fand von den PBMC bei keinem Stimulationsansatz statt. 60% der Blutspender insgesamt zeigten während der Stimulation mit Tetanus Toxoid eine schwache bis mittlere IFNγ-Expression. Die $NiSO_4$-Stimulation führte bei 70% (10^{-4}M, 10^{-5}M) bzw. 60% (10^{-6}M) der Nickel-allergischen Blutspender zu einer starken IFNγ-Expression. Dagegen exprimierten nur 60% (10^{-5}M) bzw. 40% (10^{-4}M, 10^{-6}M) der nicht-allergischen Kontrollpersonen IFNγ in schwachem Maße.

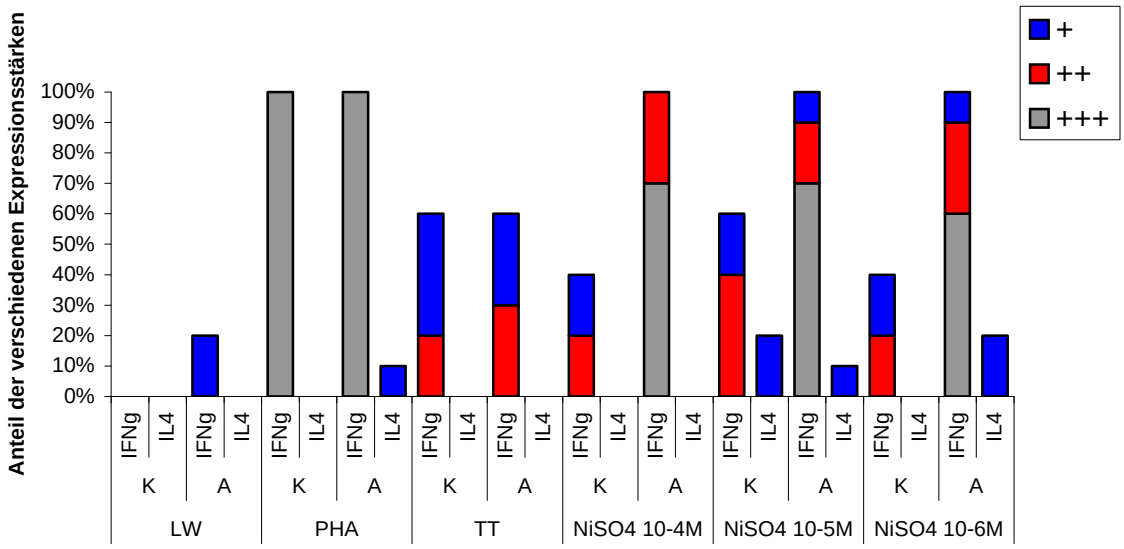


Abb. 32: RT-PCR mit IFNγ- und IL4-spezifischen Primern von PBMC von 10 Nickel-allergischen (A) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (K) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) nach 96h Stimulation; angegeben ist der jeweilige Anteil der verschiedenen Expressionsstärken (+++ = starke Expression, ++ = mittlere Expression, + = schwache Expression)

Abb. 33, die die Ergebnisse nach 144h Stimulationsdauer darstellt, bestätigt die vorangegangenen Daten. Es fand kaum Expression, weder IFNγ, noch IL4, in der unstimulierten Kultur statt. Die PHA-Stimulation führte zu einer starken IFNγ-Expression in beiden Blutspendergruppen. Eine schwache IFNγ-Expression fand auf die Stimulation mit Tetanus Toxoid hin ebenfalls in beiden Gruppen statt (50% bzw. 60%). Mit der Verlängerung der Stimulationsdauer verstärkten sich auch die Unterschiede zwischen Nickel-allergischen und nicht-allergischen Blutspendern bei der Stimulierung der PBMC mit $NiSO_4$. Bei den Konzentrationen 10^{-4}M und 10^{-5}M zeigten sich bei den Nickel-allergischen Blutspendern nur noch starke bis mittlere Bandenstärken. Auch bei der Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-6}M war eine mittlere und starke IFNγ-Expression vorherrschend, nur bei 10% der Nickel-allergischen Blutspender zeigte sich eine schwache Bande. Eine Expression von IL4 trat auch nach 144h Stimulationsdauer nur vereinzelt und wenn, dann nur schwach auf.

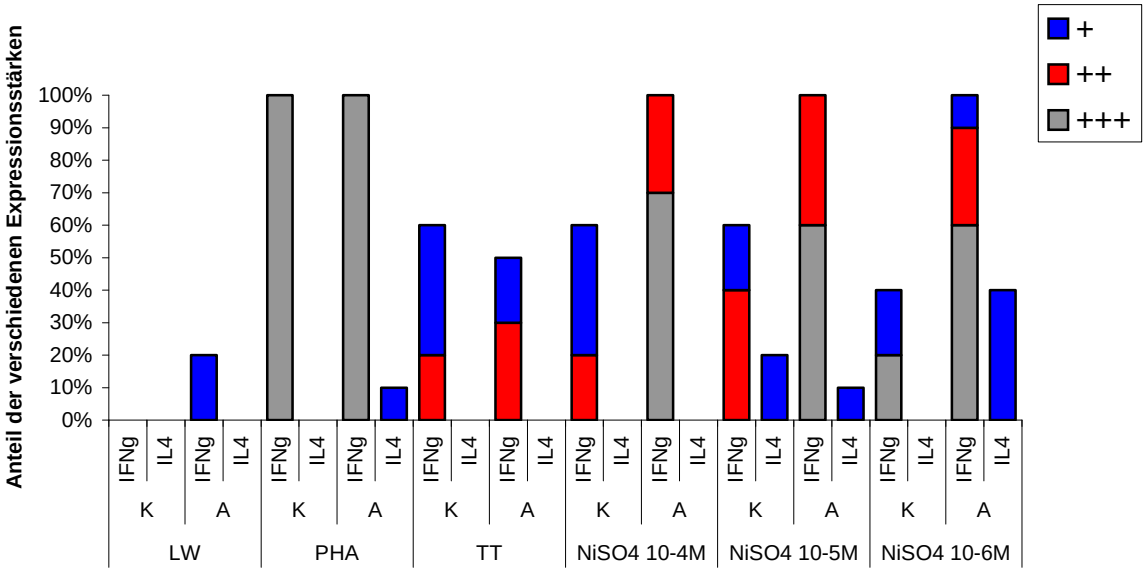


Abb. 33: RT-PCR mit IFNγ- und IL4-spezifischen Primern von PBMC von 10 Nickel-allergischen (A) und 5 nicht-allergischen Kontrollpersonen (K) nach Stimulation mit Medium (LW), PHA, Tetanus Toxoid und $NiSO_4$ (10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M) nach 144h Stimulation; angegeben ist der jeweilige Anteil der verschiedenen Expressionsstärken (+++ = starke Expression, ++ = mittlere Expression, + = schwache Expression)

4.7 Analyse der PBMC nach In-vitro-Stimulation mittels Durchflusszytometrie

Nachdem sich Hinweise auf eine Kinetik der T-Zellaktivierung unter Nickelexposition ergeben hatten – dies wurde modellhaft anhand der Expression des CD69-Aktivierungsmarkers an Nickel-stimulierten PBMC von einigen Nickel-allergischen Blutspendern in der Durchflusszytometrie gezeigt (Daten hier nicht dargestellt) – wurde auch nach dem zeitlichen Verlauf der Zytokinexpression unter verschiedenen Stimulationsbedingungen gefragt. 5 Nickel-allergische und 5 nicht-allergische Kontrollpersonen dienten als Blutspender. Die isolierten PBMC wurden über 5 Tage mit Medium, PHA oder $NiSO_4$ 10^{-5}M stimuliert. Nach 72h und nach 144h wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie (FACScan) mittels intrazytoplasmatischer Färbung analysiert (CD25 nur durch Oberflächenfärbung). Im Folgenden sind die Änderungen der Zytokinexpression der T-Lymphozyten (Gegenfärbung mit CD3-FITC, „Lymphozytengate“) gegenüber dem Leerwert nach Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-5}M dargestellt (Abb. 34). Dabei betrug der Anteil der Zytokin-produzierenden Zellen an den Gesamt-T-Zellen 3-5%.

Man erkennt nach 72h Stimulation der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender eine signifikant verstärkte IL2-Expression der T-Lymphozyten gegenüber den T-Lymphozyten der nicht-allergischen Kontrollpersonen (19,7% vs 2,96%). Ebenso ist die Expression von IL4, IFNγ und TNFα bei den T-Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender leicht erhöht (5,11%, 5,08% sowie 7,03%, Abb. 34a).

Die durchflusszytometrische Analyse nach 144h Stimulationsdauer zeigte zum Teil eine Verstärkung der Expression im Vergleich zu den Ergebnissen nach 72h Kultur (Abb. 34b). So war die Expressionänderung von IFNγ in T-Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender von 5,08% auf 22,1%, die von TNFα von 7,03% auf 21,12% gestiegen. Die erhöhte IL2-Expression der T-Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender hatte sich dagegen im Verlauf der Stimulation nicht geändert. Ebenso war eine signifikante Zunahme der IL12p70-Expression in den T-Lymphozyten der Nickel-allergischen Blutspender im Vergleich zu denen der nicht-allergischen Blutspender zu verzeichnen (19,71% vs 4,7%). Diese Ergebnisse sind insofern interessant, da eine derartige Zytokinexpression aus den Ergebnissen aus 4.4.3 – 4.4.5 mittels ELISA nicht ersichtlich wird. Mittels ELISA wird im Überstand natürlich nur die jeweilige Zytokinansammlung am Ende der Kultur bestimmt, in der Durchflusszytometrie besteht die Möglichkeit den aktuellen Produktionsstatus

weniger Zellen zu bestimmen. Eine mögliche Erklärung könnte also eine Zytokinproduktion von nur wenigen Antigen-spezifischen Zellen in der Kultur sein, so daß im ELISA diese geringe Produktion nicht bestimmt werden kann. Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die signifikant verminderte Expression des IL2-Rezeptors (CD25) im Verlauf der Stimulationskultur. So bildeten die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender nach 144h Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-5}M im Mittel 23,61% weniger CD25 im Vergleich zu den PBMC der nicht-allergischen Blutspender (2,06% weniger CD25).

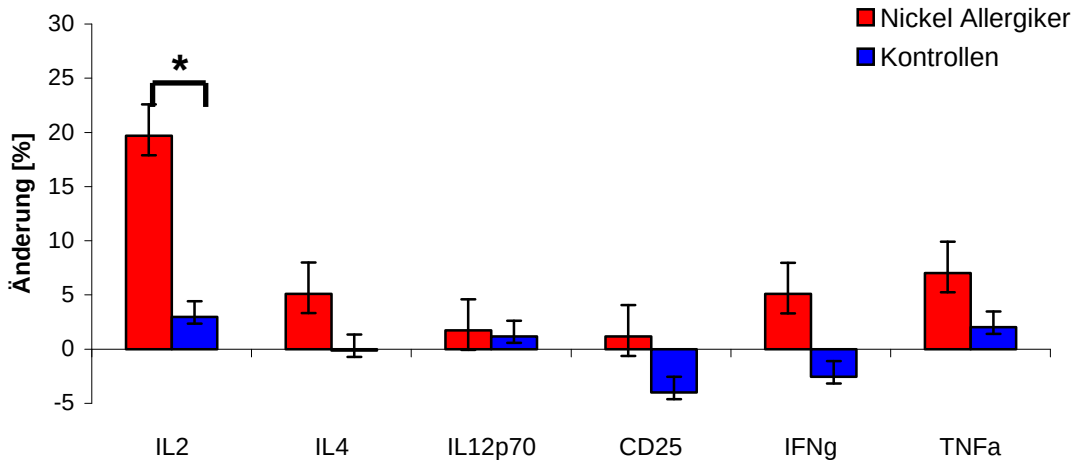


Abb. 34a

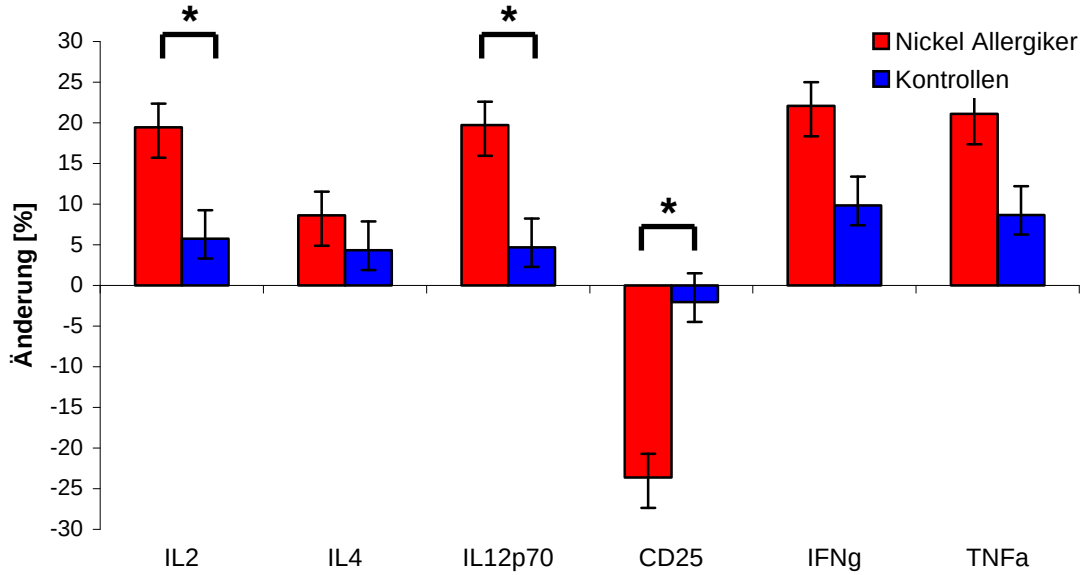


Abb. 34b

Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der In-vitro-Zytokinexpression in T-Lymphozyten. Durchflusszytometrische (FACScan) Analyse der PBMC von 5 Nickel-allergischen und 5 nicht-allergischen Blutspendern nach Stimulation mit $NiSO_4$ 10^{-5}M nach 3 (34a) und 6 Tagen (34b). Es wurde ein Analyse-Gate über T-Lymphozyten (anti-CD3-Färbung) gesetzt. Angegeben ist der Median der Veränderung der Anzahl der gefärbten T-Zellen gegenüber dem Leerwert (Kulturmedium ohne Zusätze). * = $p < 0,05$ (Wilcoxon Rangsummentest)

4.8 Gewebeuntersuchungen

4.8.1 Oligoklonalität in Biopsien aus Nickel-Epikutantestreaktionen Nickel-allergischer Personen

10 Biopsien aus mit Ekzem reagierenden („positiven“) Nickel-Epikutantestfeldern von Nickel-allergischen Patienten und 4 Biopsien aus Nickel-Epikutantestfeldern ohne Reaktion (nicht Nickel-allergische Patienten) wurden verarbeitet. Die DNA wurde gemäß dem im Methodenteil genannten Protokoll isoliert und jeweils die vier PCR-Ansätze zur Klonalitätsanalyse durchgeführt.

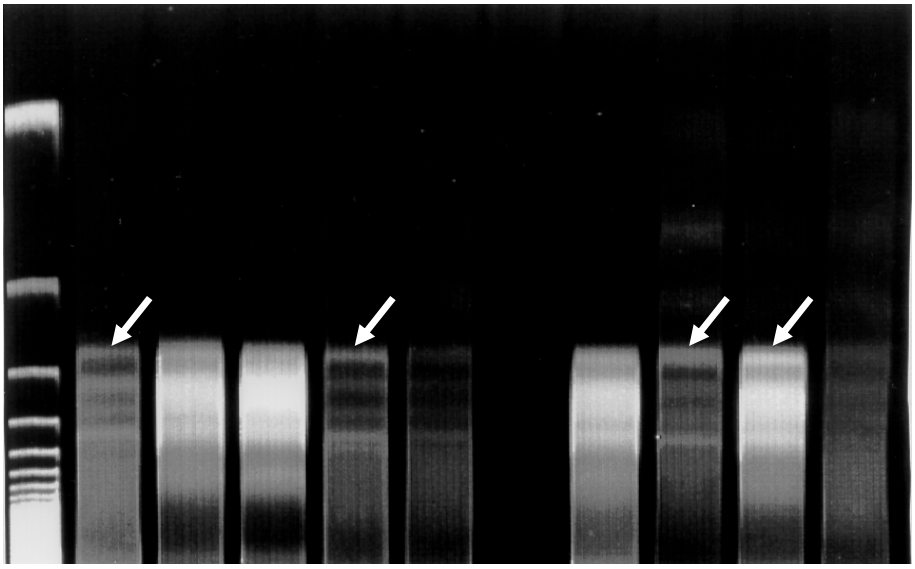
Die Analyse der möglichen T-Lymphozyten-Klonalität als Hinweis für eine Expansion weniger (antigen-spezifischer) T-Zellklone ist in Abb. 35 am Beispiel der Proben X1-X10 zu sehen. Es werden nur diese Ergebnisse dargestellt, da nur 10 Proben auf ein Gel geladen werden konnten. Die Numerierung X1-X14 erfolgte nach der zeitlichen Reihenfolge der Probeentnahmen. X4 und X10 sind dabei Proben aus klinisch reaktionslosen Nickel-Epikutantestfeldern (K = Kontrolle), die übrigen stammen aus positiven Nickel-Epikutantestfeldern (A = Allergiker). In 4 der Proben (X1, X4, X8 und X9) ist eine deutliche Bande für die TZRγ-Familie 2 zu erkennen, die restlichen Proben sind auf diesem Bild eindeutig negativ.

Abb. 36 zeigt die Verteilung der TZRγ-Familie 9 in den Proben X1-X10. Hier zeigte sich nur bei der Probe X9 eine klare Vγ9-spezifische Bande.

Die TZRγ-Familie 10 war in den Proben X1-X10 nicht vertreten (Abb. 37). Es gab nur eine schwache entsprechende Bande in den Proben X7 und X9. Diese schwachen Banden wurden aber nicht als positives Ergebnis beurteilt.

Keine der Stanz-Biopsien zeigte eine positive Vγ11-Bande (Abb. 38).

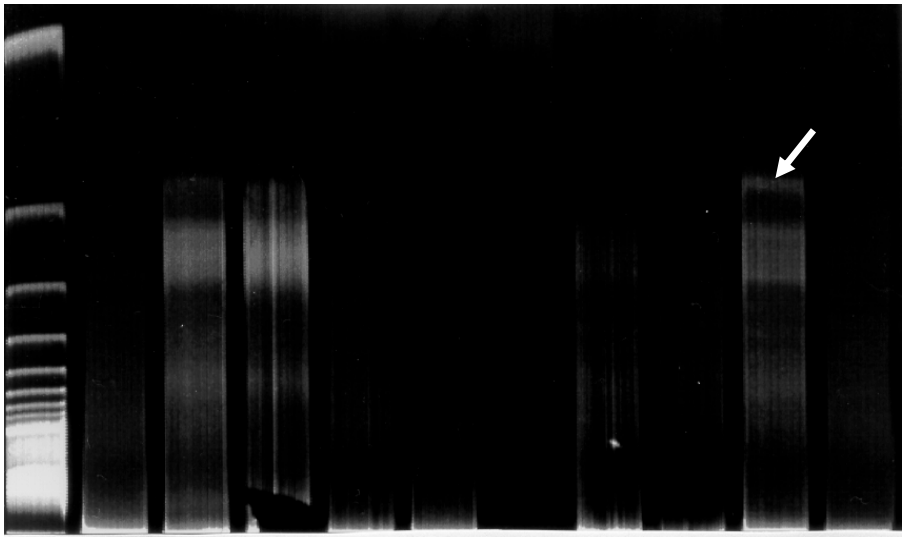
TZRγ-Familie 2



M X1(A) X2(A) X3(A) X4(K) X5(A) X6(A) X7(A) X8(A) X9(A) X10(K)

Abb. 35: Analyse bzgl. T-Zell-Klonalität aus 10 verschiedenen Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen von 8 Nickel-allergischen Patienten (A) und 2 nicht-allergischen Patienten (K). Nach DNA-Isolierung erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 2 und Auftrennung im Polyacrylamidgel (M = 100bp-DNA-Größenstandard; ⇒ = positive Bande)

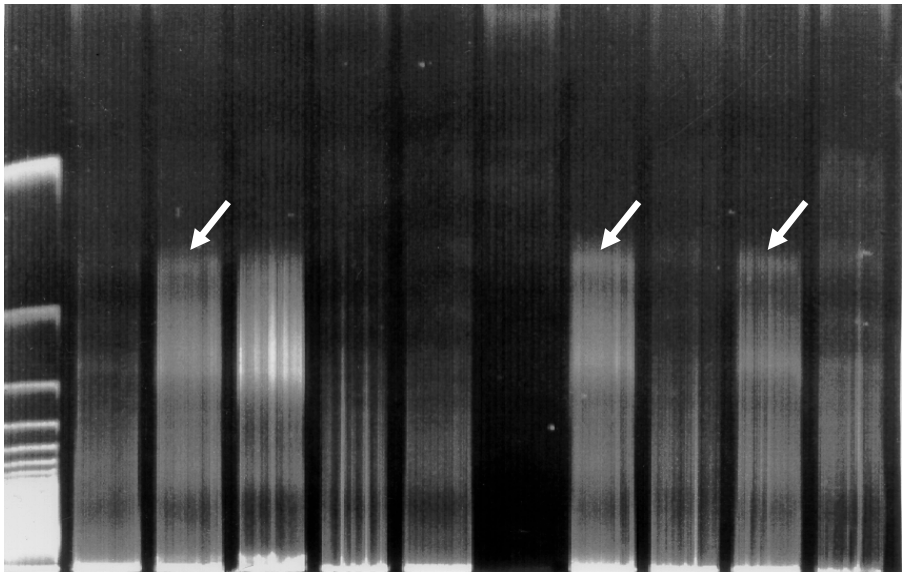
TZRγ-Familie 9



M X1(A) X2(A) X3(A) X4(K) X5(A) X6(A) X7(A) X8(A) X9(A) X10(K)

Abb. 36: Analyse bzgl. T-Zell-Klonalität aus 10 verschiedenen Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen von 8 Nickel-allergischen Patienten (A) und 2 nicht-allergischen Patienten (K). Nach DNA-Isolierung erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 9 und Auftrennung im Polyacrylamidgel (M = 100bp-DNA-Größenstandard, ⇒ = positive Bande)

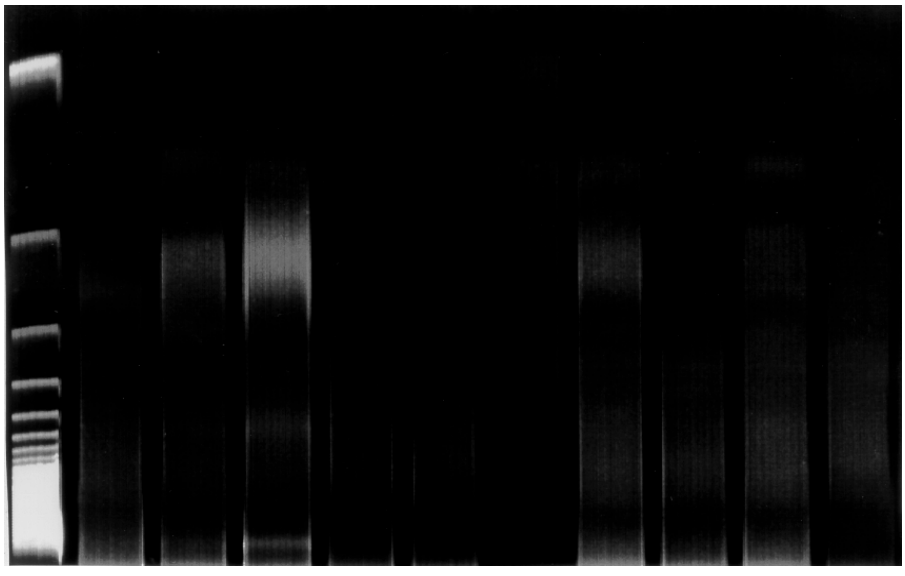
TZRγ-Familie 10



M X1(A) X2(A) X3(A) X4(K) X5(A) X6(A) X7(A) X8(A) X9(A) X10(K)

Abb. 37: Analyse bzgl. T-Zell-Klonalität aus 10 verschiedenen Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen von 8 Nickel-allergischen Patienten (A) und 2 nicht-allergischen Patienten (K). Nach DNA-Isolierung erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 10 und Auftrennung im Polyacrylamidgel (M = 100bp-DNA-Größenstandard, ⇒ = sehr schwache positive Banden)

TZRγ-Familie 11



M X1(A) X2(A) X3(A) X4(K) X5(A) X6(A) X7(A) X8(A) X9(A) X10(K)

Abb. 38: Analyse bzgl. T-Zell-Klonalität aus 10 verschiedenen Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen von 8 Nickel-allergischen Patienten (A) und 2 nicht-allergischen Patienten (K). Nach DNA-Isolierung erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für die TZRγ-Familie 11 und Auftrennung im Polyacrylamidgel (M = 100bp-DNA-Größenstandard); in dieser Abbildung keine spezifische Bande in den Proben; Klonalitätssignale wurden erst ab einer „deutlichen Expression“ (= „++“) als positiv gewertet

Zusammengefaßt ergab sich für die Epikutantestbiopsien v.a. eine Oligoklonalität der TZRγ-Familie 2, die die Familien 1 bis 8 zusammenfasst (Tabelle 8). Interessanterweise zeigte sich auch bei einigen Kontrollbiopsien, d.h. bei Personen die auf epikutane Testung mit Nickel keine klinische Ekzemreaktion entwickelt hatten, ein oligoklonales Muster der TZRγ-Familie 2. Diese Beobachtung wird im Kapitel 5.7.1 genauer diskutiert. Die Familien 9 und 10 waren nur jeweils drei- bzw. zweimal bei den Nickel-allergischen Patienten vertreten, die TZRγ-Familie 11 überhaupt nicht (nur „deutliche“ Signale, d.h. „++“, wurden als positiv bewertet).

	Klonalität			
Gewebe	**Vγ2**	**Vγ9**	**Vγ10**	**Vγ11**
X1 (A)	+++	-	-	-
X2 (A)	-	++	+	-
X3 (A)	-	-	-	+
X4 (K)	+++	-	-	-
X5 (A)	-	-	-	-
X6 (A)	-	-	-	-
X7 (A)	-	-	++	-
X8 (A)	+++	-	-	-
X9 (A)	+++	+++	++	-
X10 (K)	-	-	-	-
X11 (A)	+++	-	-	-
X12 (A)	+++	++	+	+
X13 (K)	-	-	-	-
X14 (K)	+++	-	-	-

Tabelle 8: Ergebnis der Klonalitätsanalyse der Epikutantest-Stanzbiopsien (+ = schwache Bande, ++ = mittlere Bande, +++ = starke, positive Bande; A = Biopsie aus Nickel-positivem Epikutantestfeld; K = Biopsie aus negativem Epikutantestfeld)

Abb. 39 zeigt die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse der Epikutantest-Biopsien zusammengefasst. Es fällt auf, daß die TZRγ-Familie 2 auch in den Kontrollstanzen (Hautareale mit negativem Nickel-Epikutantest bei nicht-allergischen Patienten) zu 50% vertreten war. In den positiven Epikutantest-Biopsien der Nickel-Allergiker zeigten dagegen 80% der Proben ein klonales T-Zellinfiltrat, wobei hier auch die TZRγ-Familie 10 vertreten war. Zusätzlich zeigten sich bei der Probe X9 auch die beiden Familien Vγ2 und Vγ9 zusammen.

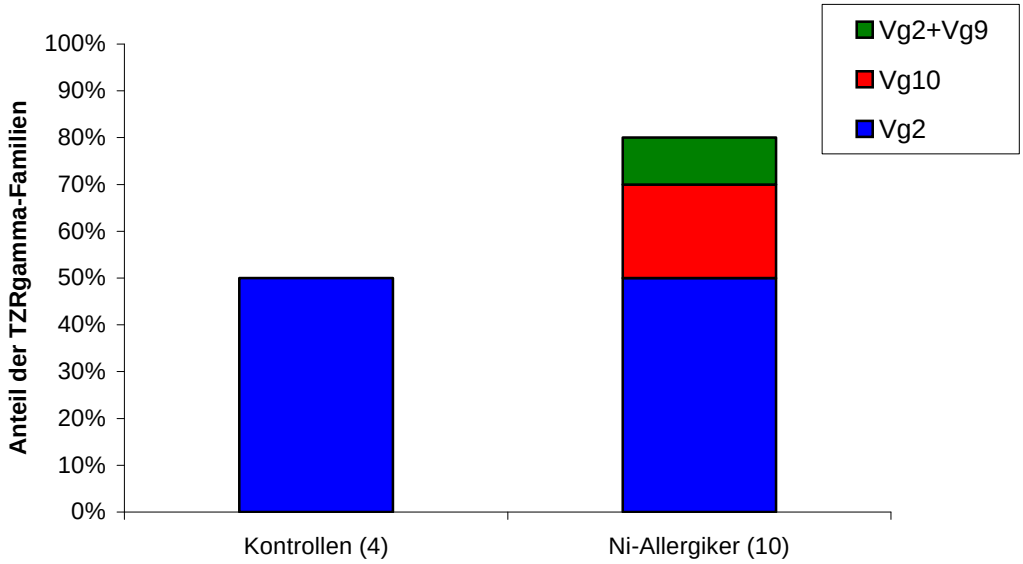


Abb. 39: Anteil der TZRγ-Familien in Hautbiopsien aus Nickel-positiven Epikutantestfeldern von 10 Nickel-allergischen Patienten und 4 Biopsien aus negativen Nickel-Epikutantestfeldern nicht-allergischer Patienten

4.8.2 RT-PCR aus periimplantärem Gewebe

Über die orthopädische Klinik der TU München wurde uns Gewebe, das bei Patienten mit Hüft-TEP-Operationen (Revisionsoperationen aufgrund von aseptischer Lockerung oder erstmaliger Einbau aufgrund von Arthrose) gewonnen wurde, zur ergänzenden Analyse zur Verfügung gestellt (Patienten s.a. 3.2, S. 22). Alle Patienten bekamen oder hatten bereits ein unzementiertes Kobalt-Chrom-Implantat der gleichen Firma. Nach der Isolierung der RNA und DNA erfolgte über RT-PCR eine Bestimmung der Expression verschiedener Entzündungsmediatoren (IL-4, IL-5, TNF-α und IFN-γ). Parallel dazu erfolgte aus der DNA eine Klonalitätsanalyse des TZRγ.

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der 17 Patienten im Überblick. IL4 war nur bei Erst-Einbau-Gewebeproben (3/5) exprimiert, ebenso IL5 (1/5). TNFα wurde in 8 Gewebeproben exprimiert, dabei 4/5 Ersteinbau-Gewebeproben. Vorherrschend war allerdings die IFNγ-Expression (deutliche Expression in 12 von 17 Proben (dabei 11/12 Proben von Revisionsoperationen). Ebenso konnte in 8 Proben ein klonales T-Zellinfiltrat nachgewiesen werden.

Patient	Alter	Operation	RT-PCR					Klonalität			
			β-actin	IL-4	IL-5	TNF-α	IFN-γ	Vγ2	Vγ9	Vγ10	Vγ11
BT	82	Re-Op	++	-	-	-	+++	+	+	+	-
BJ	76	Re-Op	++	-	-	++	-	+	-	-	+
DJ	84	Erst-Einbau	++	+	-	+++	-	-	-	-	-
FJ	74	Erst-Einbau	++	+	-	+	+++	+	+	+	+
G	63	Re-Op	++	-	-	-	+++	++	+	-	+++
L	66	Re-Op	++	-	-	+	+++	-	-	-	-
HME	72	Re-Op	++	-	-	-	+++	+	+	-	++
KH	76	Erst- Einbau	++	+++	+	++	-	-	-	++	-
H	68	Re-Op	++	-	-	-	+++	-	-	-	+++
RK	64	Erst-Einbau	++	-	-	-	-	-	-	-	-
RE	69	Re-Op	++	-	-	-	++	+	-	+	+++
S	75	Re-Op	++	-	-	+	+++	-	+	+	-
T	61	Erst-Einbau	++	-	-	++	-	+	+	-	+
TK	91	Re-Op	++	-	-	-	+	+	+	+	-
VR	76	Re-Op	++	-	-	-	+++	+	-	-	+
A1	67	Re-Op	++	-	-	+	+++	-	-	-	-
A2	68	Re-Op	++	-	-	-	+++	+	++	+	+++

Tabelle 9: Ergebnis der Klonalitätsanalyse und der RT-PCR periimplantärer Gewebeproben (- = keine Expression, + = schwach exprimiert, ++ = deutlich exprimiert, +++ = stark exprimiert); Re-Op = Revisionsoperation nach aseptischer Lockerung, Erst-Einbau = erstmalige TEP-Operation nach Arthrose

Abb. 40 zeigt graphisch die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse in den periimplantären Gewebeproben. Insgesamt zeigten 3/5 Gewebeproben bei Erst-OP sowie 10/12 Revisions-OP-Proben Klonalitätssignale. Wertet man die Signale erst ab einer „deutlichen Expression“ (= „++“; in Absprache mit PD Dr. Sander) als Nachweis einer entsprechenden klonalen T-Zellexpansion, dann haben nur 20% (= 1/5) der Proben aus erstmalig zur Implantation vorgesehenem Gewebelager ein T-Zellinfiltrat mit Zugehörigkeit zu einer TZRγ-Familie. Andererseits fand sich in 66,66% (8/12) der Gewebeproben, die im Rahmen einer Revisionsoperation gewonnen worden waren, ein T-Zellinfiltrat mit einer TZRγ-Spezifität. Dabei war mit 41,67% (5/12) die TZRγ-Familie 11 vertreten.

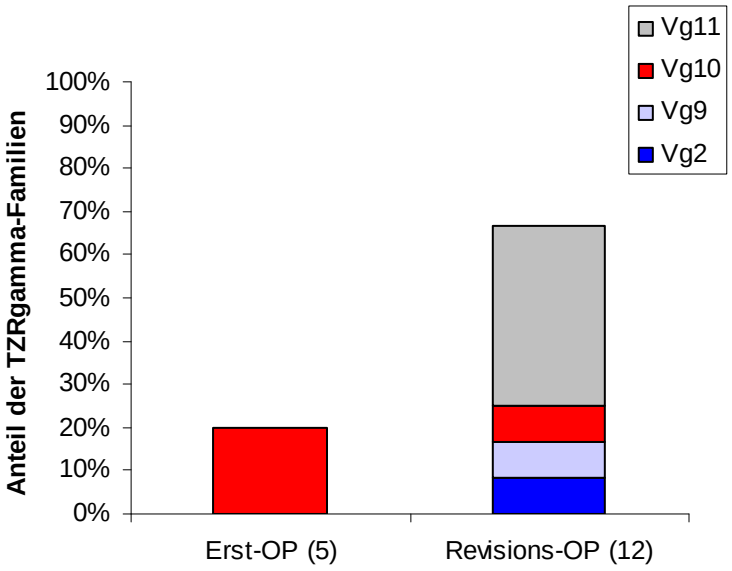


Abb. 40: Anteil der verschiedenen TZRγ-Familien im periimplantären Gewebe von Patienten mit erstmaligem Einbau einer Hüftendoprothese (5 Patienten) oder bei einer Revisionsoperation (12 Patienten); Klonalitätssignale wurden erst ab einer „deutlichen Expression“ (= „++“) als positiv gewertet

Abb. 41 zeigt ein Beispiel einer Klonalitätsanalyse im periimplantären Gewebe des Patienten H aus Tabelle 9, das bei einer Revisions-Operation nach aseptischer Lockerung gewonnen wurde. Deutlich ist die TZRγ-spezifische Bande für die Familie 11 zu erkennen (als „+++“ gewertet).

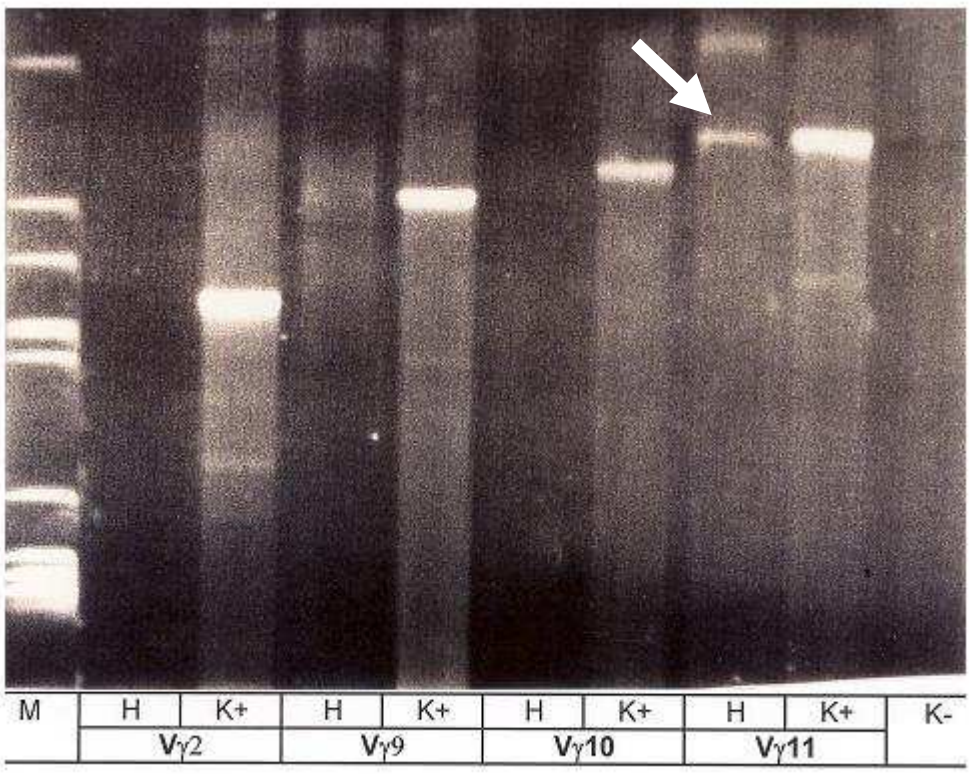


Abb. 41: Beispiel eines oligoklonalen Infiltrates in der TZR-γ-Rearrangement-Analyse im periimplantären Gewebe eines Patienten mit Hüftendoprothese; H = Patient, K+ = jeweilige Positivkontrolle, M = DNA-Marker

Bei Analyse (RT-PCR) der Expression verschiedener Entzündungsmediatoren in den Proben, zeigten sich je nachdem ob das Gewebe von einer erstmaligen Hüftendoprothesen-Operation stammte oder von einer Revisionsoperation, deutliche Unterschiede (Abb. 42). Im ersten Fall zeigte sich meist eine Expression von IL4 (3/5 Proben), und von TNFα (4/5 Proben) sowie IL5 bei einem Patienten. IFNγ war nur bei einer von 5 Gewebeproben vor erstmaliger Implantation zu sehen. Anders die Situation bei Revisionsoperationen: IL4 und IL5 fehlten in den Gewebeproben komplett und TNFα wurde nur in einem sehr geringen Maße gebildet (30% schwache Expression). IFNγ war dagegen das vorherrschende Zytokin. Es wurde in 90% der Gewebeproben exprimiert, dabei zeigten über 70% eine starke Expression.

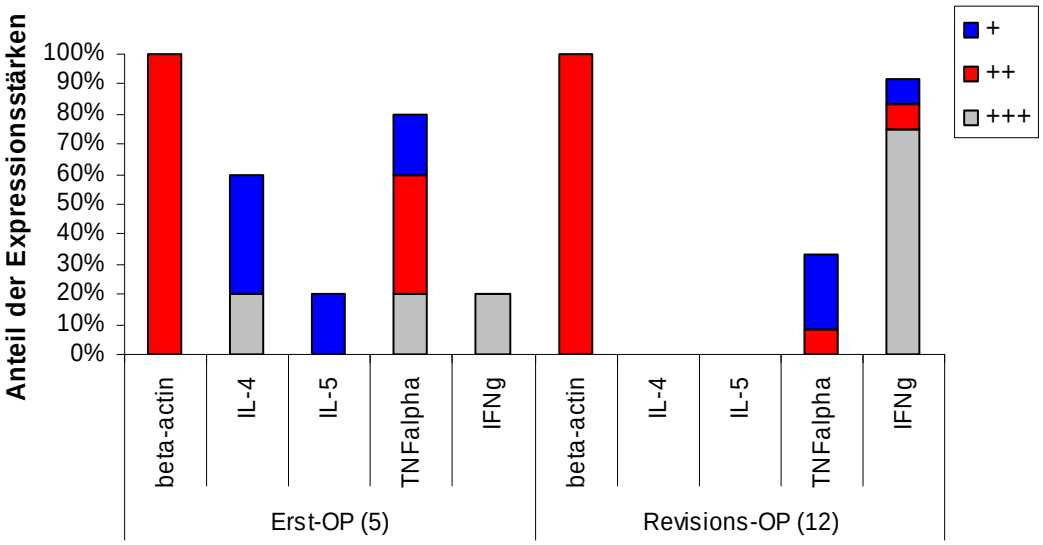


Abb: 42: Anteil der verschiedenen Expressionsstärken der Zytokine IL4, IL5, TNFα und IFNγ im periimplantären Gewebe um Hüftgelenksendoprothesen bei erstmaligem Einbau (5 Patienten) oder bei Revisionsoperation (12 Patienten); + = schwache Expression, ++ = deutliche Expression, +++ = starke Expression

4.8.3 Erweiterte Zytokinexpression im periimplantären Gewebe

Eine Folgeserie von bei Revisionsoperationen von Hüftendoprothesen gewonnenen Gewebeproben konnte verarbeitet werden, da im Rahmen einer Studie der Orthopädischen Klinik der TU München viele Patienten einer ergänzenden Gewebeuntersuchung zugestimmt hatten. Dabei handelte es sich um 8 Gewebeproben aus der „Pseudokapsel“, um 4 Proben aus dem „distalen Interface“ und um 13 Gewebeproben aus dem „proximalen Interface“. Diese Bezeichnungen kennzeichnen den Ort der Entnahme. Die Pseudokapsel ist eine bindegewebsartige Struktur, die sich nach Einbringen des Implantates in den Folgemonaten um das Implantat bildet. Das Interface stellt die Grenzfläche der Pseudokapsel dar, wobei distal, die vom Implantat abgewandte Seite darstellt und proximal die dem Implantat zugewandte Seite. Diese Gewebeproben wurden nun mit Hilfe der quantitativen RT-PCR im LightCycler untersucht. Diese erweiterte Analysemöglichkeit stand uns erst zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchungen zur Verfügung und wurde für diese Probenserie genutzt. So war eine quantitative Gegenüberstellung der RT-PCR-Ergebnisse möglich. Dabei erfolgten PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern für folgende Zytokine: IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13, IFNγ, TNFα, TGFβ, E-Selektin und Foxp3. Dabei repräsentieren die Zytokine IL4, IL5 und IL13 eher ein Th2-Muster, IFNγ dagegen eher ein Th1-Muster, TNFα spricht für eine Makrophagenbeteiligung. IL10, TGFβ und Foxp3 stellen Zytokine dar, die an gegenregulatorischen und antiinflammatorischen Prozessen beteiligt sind. E-Selektin stellt ein Protein dar, das bei vaskulären Adhäsionsprozessen (speziell auch Lymphozyten-Adhäsion) eine wichtige Rolle spielt und IL6, sowie IL8 (als Granulozyten-Chemokin) sind ebenfalls an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Da diese Proben eigentlich für andere Untersuchungen vorgesehen waren, konnte uns nur sehr wenig Material zur Verfügung gestellt werden. Aus diesem Grund konnte eine parallele Klonalitätsanalyse nicht durchgeführt werden. So wurde bei dieser 2. Gewebeserie das Hauptaugenmerk auf die Zytokinexpression gelegt.

Wie aus Abb. 43 ersichtlich wird - mit der Einschränkung der verschiedenen Probenzahlen bei den verschiedenen Gewebearten - , zeigen die Ergebnisse keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die Lokalisation der Gewebeproben, außer bei IL6, das in der Pseudokapsel deutlich mehr produziert wurde als in den beiden Interfaces. TGFβ, E-Selektin und IL8 sind gegenüber dem Standard β-2-

Mikroglobulin erhöht, die übrigen Mediatoren liegen im Verhältnis darunter. IL5 und IL13 wurde in den Gewebeproben nicht synthetisiert.

Bei einigen Gewebeproben ließ sich – mit Einschränkung der geringen Fallzahlen – auch ein gewisses Muster erkennen. So war in 4 Proben unterschiedlicher Lokalisation E-Selektin deutlich erhöht. Gleichzeitig war das Verhältnis von IL10 zu β-2-Mikroglobulin im Vergleich zu den anderen Proben erniedrigt, IL6 dagegen erhöht. Dieses Muster könnte einen Hinweis für aktive Entzündungsvorgänge zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme darstellen. In einem Großteil der Gewebeproben war dagegen ein IL10- und TGFβ-dominiertes Zytokinmuster zu erkennen. In diesem Fall war in den Gewebeproben IL6 deutlich erniedrigt. Hier waren wohl gegenregulatorische Immunmechanismen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme aktiv. Ein Th2-Muster mit einer mäßigen IL4-Expression konnte in 2 Gewebeproben gefunden werden. In diesen beiden Proben war auch IL10 sowie Foxp3 erhöht, so daß man in diesem Fall ein gegenregulatorisches Muster erkennen kann.

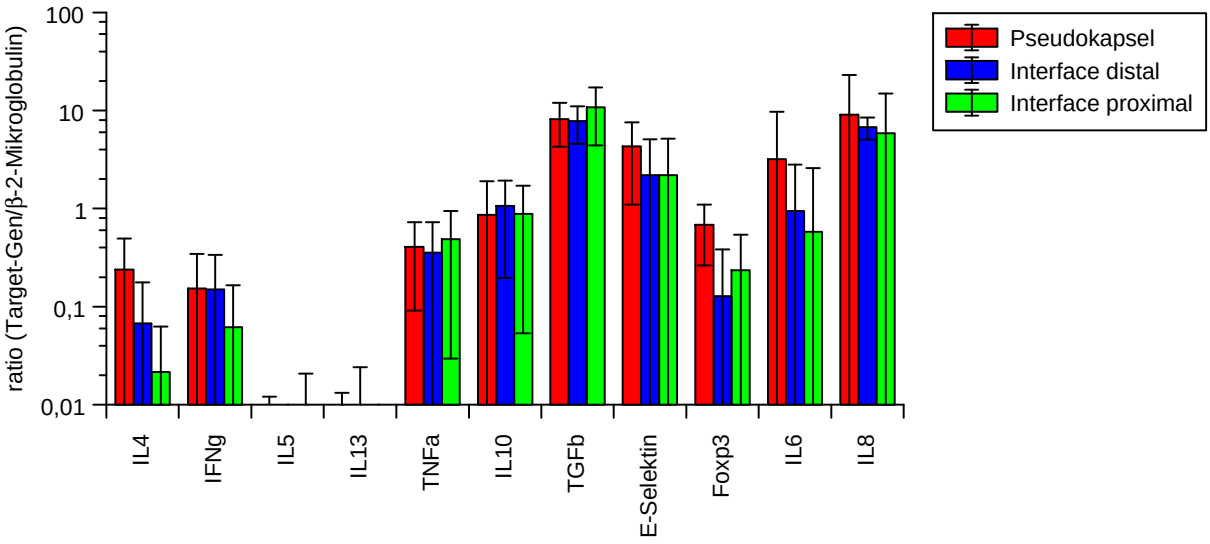


Abb. 43: Expression verschiedener Mediatoren in unterschiedlichen Arealen rund um Hüftgelenksendoprothesen (Pseudokapsel n = 8, „distales Interface“ n = 4, „proximales Interface“ n = 13). Die Analyse erfolgte mittels quantitativer PCR. Die Werte sind als Verhältnis des jeweiligen Mediators zum Standard beta-2-Mikroglobulin dargestellt.

Zur zusätzlichen Größenüberprüfung der Amplifikationsprodukte der quantitativen RT-PCR-Ergebnisse im LightCycler wurden die PCR-Produkte zusätzlich auf Polyacrylamidgele aufgetragen. Abb. 44 zeigt ein Beispiel der RT-PCR für 7 verschiedene periimplantäre Gewebeproben. Proben wie die Proben Nr. 1,3 und 7 wurden nicht in die Auswertung mit aufgenommen, da bereits die PCR mit den

„house keeping genes“ (β-2-Mikroglobulin, GAPDH) keine amplifizierbare cDNA anzeigten. Es traten zwar in den β-2-Mikroglobulin- und GAPDH-negativen Proben spezifische Banden für TNFα und IL5 auf, trotzdem wurden diese Ergebnisse nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

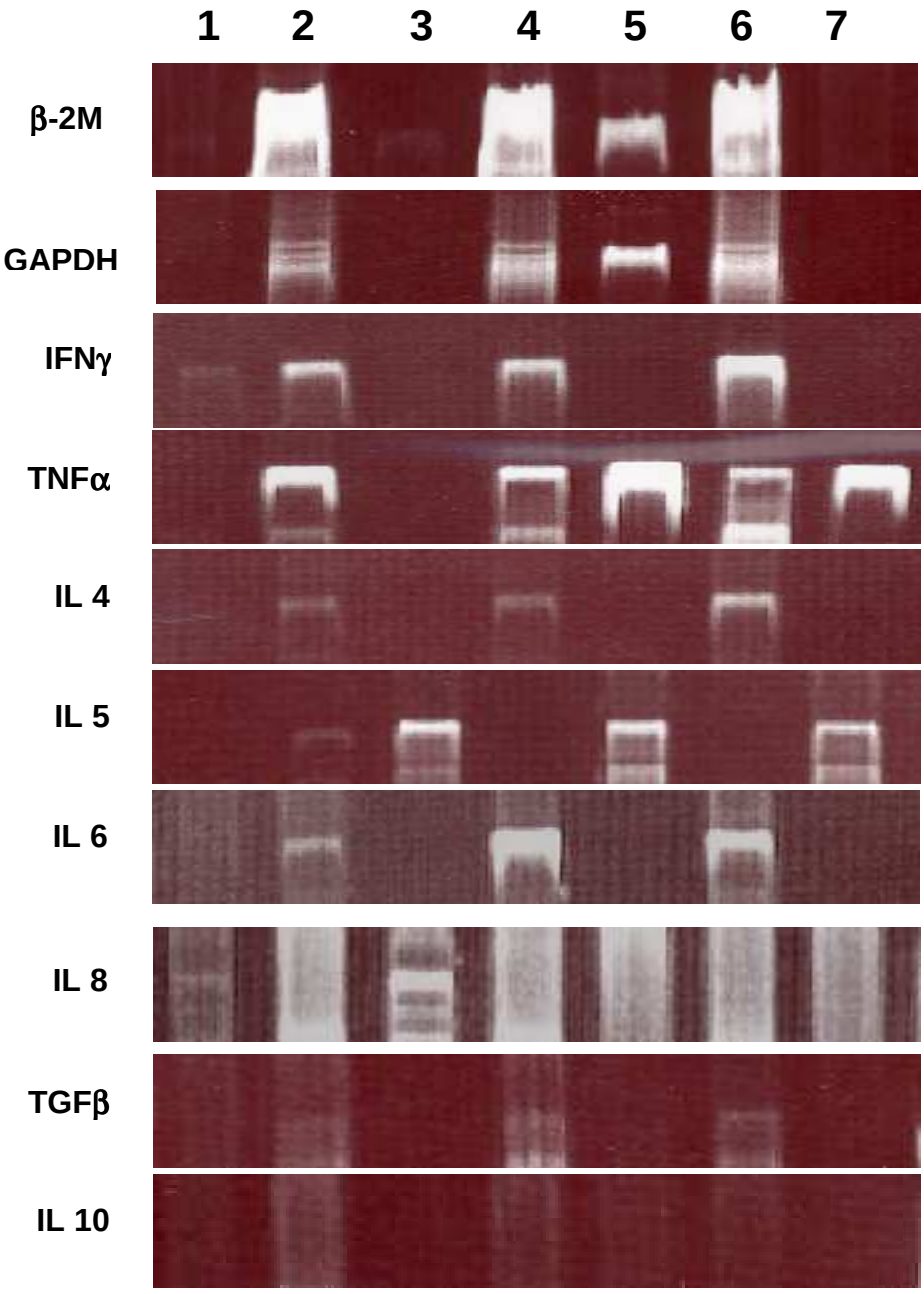


Abb. 44: Beispiel der Expression verschiedener Mediatoren aus 7 periimplantären Gewebeproben mit unterschiedlicher Lokalisation (1 = „distales Interface“, 2,3,5 = „proximales Interface“, 4,6,7 = Pseudokapsel)

5 Diskussion

Im täglichen Leben besteht sehr häufig Kontakt mit den verschiedensten Metallen, sei es im Beruf oder im Privatleben. Dabei können sich auch Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp (Ekzemtyp) entwickeln. Nickel stellt hier das wichtigste kutane Kontaktallergen dar. Andererseits steigt durch den immer häufigeren Einsatz metallischer Implantate das Risiko auch Unverträglichkeitsreaktionen von „innen heraus“ bzw. in tieferen Gewebebereichen durch den Metallkontakt zu entwickeln. Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in Zusammenschau mit den bisher bekannten Daten diskutiert.

5.1 Toxizitätsbestimmung verschiedener Metalle

Durch die Bestimmung der Toxizität der vier verschiedenen Metalle Nickel, Kupfer, Chrom und Zink wurden zunächst die Konzentrationen ermittelt, mit denen später Zellen Metall-allergischer Blutspender und nicht-allergischer Personen in vitro stimuliert werden sollten.

Dabei ist Nickel ein essentielles Spurenelement, das v.a. über Wasser und Nahrung aufgenommen wird (Aufnahme etwa 300µg/Tag) und beispielsweise in Biotin, Folsäure und Vitamin B12 als Kofaktor wirkt [14]. Darüber hinaus erfolgt Nickelkontakt über viele Gebrauchsgegenstände wie z.B. Schmuck, Münzen, Werkzeuge, Maschinen, Armaturen oder Haushaltsgeräte. Es kann aber auch von innen heraus durch eine Freisetzung von Nickel aus Stahlimplantaten geschehen. Eine frühe Studie zeigt, daß „Stahlprothesen“ (14-36% Nickel) mit einer Oberfläche von 200cm² 22µg Nickel/Jahr freisetzen [77]. Das Metall wird über die Nieren, aber auch über den Schweiß wieder ausgeschieden. Gesundheitsstörungen beim Menschen werden ab ca. 0,5-2,5g Nickelaufnahme berichtet. Akut zeigten Patienten während Dialyse Übelkeit, Erbrechen, allgemeine Schwäche und Kopfschmerzen, die durch eine hohe Nickel-Freisetzung in einem Wasserbad im Dialysegerät bedingt war [140]. Die häufigsten Krankheitsbilder entstehen bei chronischer Nickelexposition. Zum einen kann die chronische Inhalation des Metalls zu Asthma, chronischer Rhinitis und Sinusitis, nasaler Polyposis und zu Perforationen des nasalen Septums führen [19], auf der anderen Seite stellen Ekzemreaktionen der Haut als Folge eines Kontaktes durch sensibilisierte Personen die häufigste durch Nickel bedingte Erkrankungsform dar [106]. Dementsprechend ist Nickel das häufigste Kontaktallergen [107].

Kupfer ist ebenfalls ein essentielles Spurenelement, das wichtig für die Hämsynthese und die Eisenabsorption ist und als Kofaktor beispielsweise in der Katalase, Cytochrom-Oxidase sowie in Peroxidasen eine wichtige Rolle spielt [104]. Es ist nach Zink und Eisen das häufigste Spurenelement im Körper. Die normale Aufnahme mit der Nahrung beträgt 1mg Kupfer pro Tag und es wird langsam über die Nieren wieder ausgeschieden [13]. Die Serumkonzentration von Kupfer beträgt bis zu 1,5mg/L bei gesunden Personen.

Zink ist ein wichtiger Kofaktor bei vielen zellulären Prozessen, eingeschlossen DNA-Synthese, Knochenbildung, Wachstum und Wundheilung. 15mg Zink wird als tägliche Aufnahme empfohlen. Zink induziert die Bildung von Metallothionein, einem metallbindenden Protein, das während der Ausscheidung eine hohe Zinkabsorption verhindert [15]. In gesunden Personen beträgt die Zinkkonzentration im Serum <1,5mg/L.

Chrom tritt in zwei grundsätzlichen Formen auf, dem trivalenten Chrom (III) und dem hexavalenten Chrom (VI). Das trivalente Chrom stellt ein wichtiges Spurenelement dar (tägliche empfohlene Aufnahme für Erwachsene 50-200µg) [91]. Die Aufnahme erfolgt mit der Nahrung, wobei hohe Chromgehalte v.a. in grünen Bananen oder Broccoli zu finden sind. Trivalentes Chrom ist relativ ungiftig. Hexavalentes Chrom ist wesentlich giftiger. So kann es bei hohen Dosen zu Gastroenteritis, toxischer Hepatitis, Erbrechen und Diarrhoe führen [12,68]. Hexavalentes Chrom ist aber auch ein wichtiges Kontaktallergen sowie Irritans. Dabei hängt das Risiko einer Sensibilisierung von der Dauer und der Menge der Exposition ab. Dies hat z.B. zur Einführung von Chrom-armem Zement geführt (wasserlösliches Chrom(VI) unter 2µg Cr(VI)/g Zement) und einen Rückgang der Chromkontaktallergierate bei Bauarbeitern bewirkt [11].

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit Nickel als dem häufigsten Kontaktallergen. Da aber in den Vorversuchen zur Bestimmung der Toxizität unter anderem auch Euro-Eluate als Modell eingesetzt wurden, wurden die oben beschriebenen vier Metalle (Nickel, Kupfer, Zink und Chrom) in den ersten Toxizitätsuntersuchungen mit einbezogen. Nickel, Kupfer und Zink sind in Euromünzen enthalten. Nachdem aus diesen Untersuchungen die in der Zellkultur subtoxisch wirkenden Dosen ermittelt waren, erfolgten die weiteren Stimulationsversuche mit Nickel.

Anhand isolierter PBMC von 5 verschiedenen Blutspendern, die zum einen als Monozyten und Lymphozyten getrennt, aber auch zusammen eingesetzt wurden, wurde die In-vitro-Toxizitätsschwelle der Metalle $NiSO_4$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$ und $CrCl_3$ bestimmt. In Anlehnung daran wurden die Konzentrationen ermittelt, die später für die Stimulationsversuche eingesetzt wurden. Dabei waren die Metallsalze zum einen einzeln eingesetzt, aber auch in verschiedenen Kombinationen als Doppelstimulation. So sollte auch ein möglicher Kombinationseffekt der verschiedenen Metallsalze erkennbar werden.

In Gegenwart der einzelnen Metallsalze ergaben sich toxische Effekte auf die Zellen bei Nickel ab 10^{-3}M (Monozyten) bzw. 10^{-2}M (Lymphozyten), bei Zink ab 10^{-3}M (Monozyten und Lymphozyten), bei Kupfer ab 10^{-4}M (Monozyten und Lymphozyten) und bei Chrom ab 10^{-4}M (Monozyten), bzw. 10^{-3}M (Lymphozyten). Diese Werte stehen auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Granchi et al., die die Toxizität von Nickel, Kobalt und Chrom gegenüber humanen Lymphozyten in vitro bestimmten [53]. Die Monozyten der 5 Blutspender erschienen im allgemeinen gegenüber den Metallionen empfindlicher als die Lymphozyten. Dies hängt vermutlich mit der Fähigkeit der Monozyten zur Phagozytose und zur Antigenprozessierung zusammen. Dies könnte einerseits bei Partikelakkumulation und andererseits auch bei höherer Aufnahme von Metallionen zu stärkeren toxischen Effekten bei Monozyten führen. Einen Hinweis dafür gibt es im Gewebe rund um Metallimplantate, wo man Monozyten/Makrophagen sehen kann, die deutlich mit Abriebpartikeln beladen sind [145]. Ein weiterer toxischer Effekt nach Metallstimulation ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von Monozyten und Makrophagen [92].

Interessant waren die Kombinationseffekte bei gleichzeitiger Stimulation mit zwei Metallsalzen. Dabei wurde jeweils nur die Hälfte der Metallsalze der Einzelstimulation eingesetzt, so daß die absolute Ionenmenge der beiden Metalle zusammen während der Stimulation die der Einzelstimulation nicht überstieg. Die toxischen Effekte der gleichzeitigen Nickel- und Zinkstimulation setzten bei 10^{-4}M ein und zeigten keine Unterschiede bei Makrophagen und Lymphozyten. Die gleichzeitige Stimulation mit Nickel und Kupfer zeigte dagegen bereits bei einer Konzentration von 10^{-5}M deutlich toxische Effekte gegenüber den Monozyten. Demgegenüber zeigten die Lymphozyten gegenüber der Kombinationsstimulation mit Nickel und Chrom und der Stimulation mit Kupfer und Zink deutlich früher toxische Effekte (10^{-5}M bzw. 10^{-6}M). Dies weist auf mögliche synergistische toxische Effekte hin. Interessant ist auch,

dass in diesen Fällen die Lymphozyten, die bei den Einzelstimulationen weniger empfindlich auf die Metallionen reagierten, nun deutlich früher abstarben. Kombinationseffekte fanden auch Riley et al. bei Untersuchungen an epithelialen Lungenzellen von Ratten. So schien die Kombination von Zink und Kupfer die Toxizität von Kupfer alleine abzuschwächen, die Kombination von Zink und Nickel führte dagegen zu einem additiven Effekt. Die mitochondriale Aktivität, die in dieser Studie als Marker für die Vitalität bestimmt worden war, wurde durch die kombinierte Stimulation von Nickel und Zink um bis zu 25% gegenüber der Stimulation mit Nickel alleine verringert [97]. Eine Erklärung für diesen Effekt konnte Riley allerdings nicht finden. Die antioxidative Wirkung von Zink wurde bereits mehrfach beschrieben [129]. So trägt Zink durch eine Reduzierung des oxidativen Stresses zu einer Stärkung der Immunantwort bei. Nickel scheint bei einer kombinierten Kombination diesen Effekt des Zink abzuschwächen. Auch bei Hautkontakt mit metallischen Gegenständen wie beispielsweise Münzen ist ebenfalls ein Kombinationseffekt der freigesetzten Metallkomponenten zu vermuten. Durch die Freisetzung metallischer Komponenten in das Gewebe um Implantate könnte ebenfalls eine Kombination verschiedener Metallionen auftreten und so eine stärkere toxische und/oder Immunreaktion hervorrufen. Dies gilt v.a. für unzementierte und unbeschichtete Metallimplantate mit einer geringen Korrosionsbeständigkeit [60,71,143].

Um die Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung genauer zu charakterisieren, wurde die Apoptoserate der Gesamt-PBMC der 5 Blutspender nach den jeweiligen Metallstimulationen bestimmt. So konnte untersucht werden, ob die Zellen durch die toxischen Effekte direkt nekrotisch werden oder es eine definierte Reaktion der Zellen gegenüber den Metallen ist, die zu der Apoptosekaskade führt. Dafür wurde die Apoptose mittels der Annexin V-Färbung bestimmt, da dadurch die Apoptose in einem sehr frühen Stadium detektiert werden kann [110]. Dabei zeigte sich, daß bei den Einzelstimulationen die Zahl der apoptotischen Zellen nur gering größer war als bei den unstimulierten Zellen. Nur Zink 10^{-3}M induzierte eine deutlich höhere Apoptoserate, dies lässt sich aber durch die höhere Konzentration erklären, die bereits über dem physiologischen Wert liegt. Dagegen führten die Doppelstimulationen der PBMC zu stark erhöhten Apoptoseraten, der Anteil der lebenden Zellen ging stark zurück. Ebenso erhöhte sich die Anzahl der nekrotischen Zellen. Einzige Ausnahme war die gleichzeitige Stimulation mit Zink und Chrom 10^{-}

^{4}M, die nicht vom Leerwert abwich. Diese Kombination schien die PBMC vor den toxischen Effekten der Metallsalze zu schützen.

Der Mechanismus der toxischen Wirkung der Metalle beruht im Falle von Nickel zum einen auf der Bindung an verschiedene Proteine des Membrantransportes wie beispielsweise DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), sowie auf einem kompetitiven Verdrängungsmechanismus des intrazellulären Calciums [138]. Chrom verursacht eine Reihe zellschädigender Prozesse zu denen Genotoxizität, Apoptose und oxidative Reaktionen gehören. Es supprimiert die Stickstoff-Monoxid-(NO)-Synthase, wohingegen Nickel die NO-Produktion erhöht [126]. Kupfer inhibiert Sulfhydrylgruppen an Enzymen, wie z.B. an der Glucose-6-phosphatase und der Glutathion-Reduktase, die die Zellen vor freien Radikalen schützt [13]. So lassen sich wegen der verschiedenen Toxizitätsmechanismen z.B. von Nickel und Kupfer auch die Kombinationseffekte im Sinne höherer Toxizität erklären. Ebenso führen hohe Zink-Mengen zu einer erhöhten Bildung freier Sauerstoffradikale [75], geringe Mengen dagegen wirken antioxidativ [129]. So tragen Chrom bzw. Nickel beispielsweise durch die Inhibierung oder die Verstärkung der NO-Produktion zu einer Immunsuppression oder einer Aktivierung des Immunsystems bei. Aus den Daten dieser Vorversuche wurden die Nickelkonzentrationen 10^{-4}M, 10^{-5}M und 10^{-6}M als geeignet für die Stimulationsversuche ermittelt und in den weiteren Versuchen in der Zellkultur eingesetzt.

5.2 Apoptoseschwelle nach Nickel-Stimulation

Das Apoptoseprogramm in der Zelle wird durch verschiedene morphologische Änderungen charakterisiert, u.a. durch den Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran. Dies findet bereits in einem sehr frühen Stadium statt. Später findet auch eine Kondensation des Zytoplasmas und des Nukleus, sowie ein Abbau der DNA statt. In apoptotischen Zellen wandert das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran und zeigt so PS der extrazellulären Umgebung. Annexin V (35-36 kDa) ist ein Ca^{2+}-abhängiges Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS.

Nickel ist eines der häufigsten Kontaktallergene des täglichen Lebens (bis zu 10% der allgemeinen Bevölkerung sind gegenüber Nickel sensibilisiert) und es ist ein gängiger Bestandteil metallischer Gegenstände, insbesondere auch von metallischen Implantaten [22,120]. In stark sensibilisierten Personen kann bereits eine kurze

Exposition gegenüber Nickel Ekzeme provozieren [85,124] und auch ungewöhnliche klinische Erscheinungsbilder wurden berichtet [3,125,146]. Die PBMC Nickel-allergischer Patienten reagieren in vitro spezifisch auf eine Nickel-Stimulation [22,120], wobei Personen, die gleichzeitig Ekzeme aufgrund einer systemischen ("hämatogenen") Exposition entwickelten, eine höhere Reaktivität zeigten [123]. Ziel unserer hier diskutierten Experimente war, herauszufinden, ob PBMC unterschiedlicher Blutspender bei Nickelexposition interindividuelle Unterschiede in Bezug auf die Toxizität oder die Apoptoseschwelle zeigen würden. Nickel ist ja einerseits wichtig als Kofaktor mancher Enzyme [14], aber in höheren Konzentrationen auch toxisch [14,36]. Dieses Phänomen einer unterschiedlichen Empfindlichkeit ist auch für andere Zellarten bekannt, z.B. bei einer Ozon-Exposition humaner Fibroblasten [79,80]. Humane Fibroblasten sind auch gegenüber Metallen in verschiedenem Ausmaß empfindlich. Mostardi et al. untersuchten die Absterberate von Fibroblasten bei Exposition gegenüber Metallen, wie z.B. Titan, Tantal, Cobalt, Chrom und ebenso auch die Effekte von entsprechenden Partikeln [87]. Sie fanden, daß sowohl die Art als auch die Menge an Metall Auswirkungen auf die Nekrose der Fibroblasten hatte, wobei jedes Metall einen bestimmten Schwellenwert zeigte. Da aber die Autoren dieser Arbeit nur Zellen von drei unterschiedlichen Personen verwendeten, wurden hier natürlich die möglichen interindividuellen Unterschiede der zellulären Reaktivität nicht deutlich. In unserer Versuchsserie zeigte sich, daß die einzelnen PBMC-Suspensionen der individuellen Blutspender eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Nickel aufweisen. Dies wurde v.a. bei der Stimulation mit den Euro-Eluaten deutlich, in denen Nickel und Kupfer in Kombination vorlagen. So lag die Apoptoserate bei nur Nickel-exponierten PBMC zwischen 0,03% und 2,88%, bei Metallkombination (hier Euro-Eluat 1:100) zwischen 0,15% und 78,16% und selbst bei der niedrigsten Eluatkonzentration noch zwischen 0,02% und 5,65%. Die Ergebnisse sind in 4.2 auf S. 52 dargestellt. Ähnliche Daten wurden auch in den vorangegangenen Versuchsserien ermittelt (4.1, S. 46), die auch deutlich erhöhte toxische Effekte und eine höhere Apoptoserate bei den kombinierten Metallstimulationen zeigten. Die Apoptose fördernde patienteneigene Faktoren wurden vor dem Experiment möglichst gering gehalten. Die Blutspender nahmen keine Medikamente, waren Nichtraucher (ausgenommmen eine Person) und ohne aktuelle Erkrankung. Während der In-vitro-Stimulation der PBMC mit Nickel tolerierten die Zellen der Nickel-allergischen Blutspender höhere

Nickelkonzentrationen und zeigten demzufolge eine geringere Apoptoserate im Vergleich zu den PBMC-Suspensionen der nicht-allergischen Personen. Für Exposition gegen $NiSO_4$ 10^{-5}M lag die Apoptoserate im Median bei 0,66% (nicht-allergische Blutspender) sowie bei 0,4% (Nickel-allergische Blutspender). Dieser Effekt war dosisabhängig.

Manche Nickel-allergischen Personen entwickeln Handekzeme selbst nach wiederholtem kurzzeitigem Kontakt mit Münzen. In Entsprechung zu einer kürzlichen Veröffentlichung [39] war auch an unserer Klinik bei der Epikutantestung mit Euro-Münzen die Auslösung von Ekzemen bei Nickel-allergischen Personen gesehen worden. So stellten wir Eluate von Euromünzen her um diese zur In-vitro-Exposition von PBMC einzusetzen. In diesem Falle konnte man wieder eine dosisabhängige Apoptose bei den PBMC-Suspensionen der 7 Nickel-allergischen Blutspender feststellen. Dabei zeigte sich wiederum der Effekt der geringeren Apoptoserate bei den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender. Zusätzlich zu dieser allgemeinen Beobachtung wurden auch deutliche interindividuelle Unterschiede bei der Auslöseschwelle für die apoptotische Reaktion bei den einzelnen Personen gefunden. Die hier gefundene Apoptoseresistenz der PBMC der Nickel-allergischen Personen könnte möglicherweise auf einer unterschiedlichen Expression des Apoptose inhibierenden Bcl-2 begründet sein. Die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie regulieren das Überleben der Zellen. Sie können die Apoptose entweder inhibieren (Bcl-2, Bcl-x_L) oder fördern (Bax, Bcl-x_S) und werden wiederum durch den nukleären Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert [4]. Nickel induziert in Zellen verschiedene Signalketten, darunter auch den Transkriptionsfaktor NF-κB [103]. Auf der anderen Seite werden die wichtigen Apoptose-Enzyme Caspase-3 und Caspase-9 über den intrazellulären Calciumspiegel reguliert [118]. Da die Nickelionen intrazellulär Calciumionen kompetitiv verdrängen und auf diese Art toxisch wirken können [14], würde dies bei den verwendeten geringen Nickelkonzentrationen ebenfalls eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Apoptosewerte darstellen. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit könnte auch zu der individuellen Reaktivität gegenüber Korrosions- und Abriebprodukten in der Nähe metallischer Implantate beitragen. Bei Gelenkersatz könnte durch eine Änderung der mechanischen und tribologischen Eigenschaften so auch die Immunreaktivität im periimplantären Gewebe geändert werden. Dies wurde bereits von verschiedenen Autoren geäußert [84,120,144].

5.3 Reifung dendritischer Zellen nach Nickelkontakt

Dendritische Zellen spielen als antigenpräsentierende Zellen eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort, da sie das Antigen nicht nur aufnehmen, sondern auch verarbeiten und anschließend in geeigneter Art und Weise den T-Zellen präsentieren. Im Laufe dieser Vorgänge verändern sich die dendritischen Zellen, sie machen einen sogenannten „Reifungsprozess“ durch. Manche Autoren vermuten, dass die Polarisierung in Richtung einer Th1- oder Th2-Antwort jeweils von verschiedenen dendritischen Zellen verursacht wird. Dabei sollen von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (myeloide oder DZ1) eher eine Th1-Antwort ausbilden und plasmazytoide dendritische Zellen (DZ2) dagegen die Th2-Antwort unterstützen [98]. Andere Publikationen dagegen fanden, dass myeloide dendritische Zellen sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine induzieren können und bestimmten die Expressionsstärke des IL12 als den entscheidenden Faktor für die Th Polarisierung [65]. Die Stärke der IL12-Produktion von dendritischen Zellen kann durch eine Vielzahl an Umgebungsbedingungen verändert werden, in der die Zellen reifen. Die Frage war nun, ob auch die Eigenschaften des Antigens oder eine individuell unterschiedliche Empfänglichkeit der dendritischen Zellen gegenüber den umgebenden Faktoren die Reifung und Funktion dieser Zellen beeinflusst. Ein Beispiel hierfür ist die proteolytische Aktivität des Derp1 Hausstaubmilbenallergens, das dendritische Zellen dazu bringt, weniger IL-12 zu produzieren [42]. Damit resultiert auch eher ein Th2-Funktionsmuster bei entsprechendem T-Zell-Kontakt. Im Gegensatz zu irritativen Substanzen wird Kontaktallergenen zugeschrieben, daß sie eine Reifung der dendritischen Zellen induzieren können. Dies geschieht über Beeinflussung verschiedener Signaltransduktionswege, v.a. der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) [9]. In unseren Versuchen wurde gezeigt, daß die Nickelexposition in unterschiedlichem Maße zu Phänotypänderungen der dendritischen Zellen führt. So wurden unter LPS-Stimulation (als „Positiv“-Kontrolle) die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD40 in beiden Blutspendergruppen deutlich stärker exprimiert. Unter Nickelexposition exprimierten die DZ der Nickel-allergischen Blutspender im Mittel 30,11% mehr CD83 gegenüber dem Leerwert. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die CD83-Expression der DZ der nicht-allergischen Blutspender unter Nickelexposition nur um 1,6%. Das Ausmaß der Änderung hing dabei vom Allergiezustand des Blutspenders ab. Diese Ergebnisse passen auch zu den Berichten von De Smedt et al., die ebenfalls vermehrt CD83 positive DZ nach

der Stimulation mit $NiCl_2$ in der Durchflusszytometrie fanden [35]. Dies deutet einerseits auf die unter Nickelexposition erleichterte Bahnung einer DZ-vermittelten T-Zellaktivierung hin und andererseits auf eine bei Nickel-allergischen Patienten veränderte Reaktivität gegenüber Nickel auch auf der Ebene der dendritischen Zellen. Dies könnte wiederum ein Faktor sein, der zu der verstärkten Immunreaktivität bei Nickel-allergischen Personen beiträgt. Auf der anderen Seite gibt es aber auch Berichte über eine mögliche Toleranzinduktion durch DZ. So wurden in der Mundhöhle DZ beschrieben, die konstitutiv den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI sehr stark exprimieren [8]. Damit ist ein antiinflammatorisches Toleranz-Milieu verknüpft, und zwar zum einen durch eine monozytäre IL-10 Produktion [93], sowie andererseits durch die Produktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), eines Tryptophan-abbauenden Enzyms [135]. Beide Faktoren reduzieren die T-zelluläre Hyperreaktivität. Klinische Bedeutung hätte dies beispielsweise bei Nickel-allergischen Zahnspangenträgern, da nicht jeder Nickel-Allergiker im Falle einer Nickel-haltigen Spange klinische Symptome entwickeln muss. Aus skandinavischen Untersuchungen ging auch hervor, daß bei ehemaligen Trägern nickelhaltiger Zahnspangen im späteren Leben seltener eine Nickelallergie entsteht [130].

5.4 Einfluß von 1% und 10% AB-Serum auf Zellkulturparameter und die Kinetik der T-Zellreaktion in vitro

Die Expansion antigen-spezifischer T-Zellen wurde quantitativ über den Einbau radioaktiv markierten Thymidins gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Nickelstimulation im Vergleich mit der typischen Recall-Antigenstimulation mit Tetanus Toxoid ebenfalls erst nach 4 Tagen zu einer als gesteigert meßbaren Proliferation führte. Im Gegensatz zu der Tetanus-Stimulation war die Nickel-induzierte Proliferation 1-2 Tage später bereits wieder rückläufig. Dies war bei der Stimulation mit Nickel 10^{-4}M deutlich zu sehen. Verschiedene Erklärungen kommen hierfür in Frage: Eine unspezifische mitogene Wirkung von Nickel wurde in früheren Arbeiten [112] diskutiert. Dagegen spricht jedoch, daß eine Proliferation nicht in den Anfangstagen der Zellkultur erkennbar ist (wie z.B. nach Einsatz von Mitogenen wie PHA oder PWM und daß die PBMC der Nickel-Allergiker mit einer deutlich höheren Proliferation auf die Nickelstimulation reagierten als die der Kontrollpersonen. Bei den schwächeren Konzentrationen zeigten sich kaum noch Unterschiede zwischen

den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender und denen der nicht-allergischen Kontrollpersonen. Es könnte auch sein, daß zum Erhalt der Nickel-induzierten In-vitro-Proliferation weitere unterstützende Signale benötigt würden, die von anderen Zellarten geliefert werden, so z.B. das von Keratinozyten produzierte Interleukin IL1β [37]. Diese Versuche wurden anfangs unter Zusatz von 1% humanem AB-Serum zum Zellkulturmedium gemacht. Es wird bereits länger diskutiert, ob Nickel als Antigen nur in Verbindung mit Proteinen erkannt wird, oder aber auch durch eine direkte Bindung an den TZR eine Aktivierung verursachen kann [18,22]. Unsere Ergebnisse würden für eine Proteinbindung sprechen, da die zelluläre Antwort in diesem Stimulationsansatz relativ gering war, was auf die geringe Proteinmenge durch den Zusatz von nur 1% humanem AB-Serum zurückzuführen sein könnte. In Vorversuchen wurde ebenfalls fötales Kälberserum getestet, das sich aber als ungeeignet erwies. Eine Nickelbindung an Serumalbumin wurde bereits gezeigt [102], aber auch größere und komplexere Proteine können Metalle binden [57]. Unter Zusatz von 10% humanem AB-Serum – diese Versuche wurden ebenfalls durchgeführt – konnte insgesamt eine bessere Stimulierbarkeit der PBMC festgestellt werden, es besteht aber in diesem Fall auch eine höhere Gefahr für unspezifische Reaktionen. In diesem Zusammenhang gibt es sehr unterschiedliche Angaben aus Publikationen, die die verschiedensten Serumzusätze favorisieren [30,55]. In Vorversuchen wurde auch autologes Serum als Mediumzusatz für die Zellkultur verwendet, hier stellt sich aber das Problem, daß auch per se unterschiedlich viel Nickel im Serum der verschiedenen Blutspender enthalten sein kann und so keine Standardisierung der Experimente möglich ist. So wurden hier in den Versuchsserien nur die Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen unter Zusatz von 1% und 10% humanem AB-Serum verglichen.

Die Klonalitätsanalyse des TZRγ stellt eine geeignete Methode dar, um eine oligoklonale antigenspezifische Expansion der T-Zellen zu analysieren. Dies wird im anschließenden Kapitel 5.5 anhand der Oligoklonalität in PBMC Nickel-allergischer Blutspender nach In-vitro-Stimulation im Detail diskutiert. Es sollte zuerst die Frage geklärt werden, wann im Vergleich mit der Pan-T-Zell Stimulation über PHA eine antigenspezifische Aktivierung zu dieser T-Zell-Expansion führt. Wie unter 4.6 auf S. 74 bereits dargestellt wurde, zeigte sich eine oligoklonale T-Zell-Expansion in der Klonalitätsanalyse des TZRγ nach Nickelstimulation am 2. Tag der Zellkultur und bestand danach für die folgenden weiteren 4 Tage fort. Wir wählten diesen Zeitraum,

da auch der Lymphozytentransformationstest gewöhnlich über einen 6-Tages-Zeitraum erfolgt [38,62]. Unter Nickelstimulation konnte eine deutliche oligoklonale T-Zell-Expansion innerhalb der PBMC Nickel-allergischer Blutspender im Vergleich zu denjenigen der Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Die klonale Expansion war auch bei der niedrigsten Nickel-Stimulationsdosis noch erkennbar. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß bereits sehr kleine Mengen eines Antigens zur Provokation einer Reaktion bei sensibilisierten Personen genügen [6,22].

Allgemein wird davon ausgegangen, daß das allergische Kontaktekzem eine typische T-zellulär vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ ist. Dabei wird die Hauptrolle CD4+ T-Zellen mit einem Th1-Zytokinmuster zugeschrieben [142]. Unsere Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin. Die Daten der RT-PCR zeigen, daß sich die IFNγ-Expression der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender bereits nach 2 Tagen deutlich erhöhte und auch über die gesamte 6-Tage-Kultur andauerte. IL4 wurde dagegen von den PBMC kaum oder nur schwach exprimiert. Dabei konnte die Auswertung der RT-PCR nur qualitativ erfolgen. Deshalb wurden für eine quantitative Aussage zusätzlich die Zellkulturüberstände mittels eines IFNγ-, eines IL4- und eines IL12p70-spezifischen ELISA untersucht. Leider konnte im Falle von IFNγ kaum eine Produktion nach Stimulation der PBMC mit $NiSO_4$ nachgewiesen werden. Die Stimulation mit PHA zeigte deutlich einen sehr frühen Anstieg der IFNγ-Produktion (nach 72h Maximalwert von 56,46ng/ml), die Stimulation mit Tetanus Toxoid dagegen führte zu einem langsameren Anstieg über den gesamten Zeitraum der Zellkultur (Maximalwert 4,96ng/ml nach 144h). Da nur sehr wenige antigenspezifische Zellen auf die Stimulation mit $NiSO_4$ reagieren, könnte dies eine Erklärung für die geringen meßbaren IFNγ-Spiegel sein. Andere Arbeitsgruppen verwenden die Methode des ELISpots, da hier die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene (qualitativ) bestimmt werden kann [76]. Da diese Methode uns zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Versuche nicht zur Verfügung stand, wurde in weiteren Versuchen die Zytokinexpression in der Durchflusszytometrie bestimmt, da dadurch auch der jeweilige zytokinproduzierende Zelltyp festgestellt werden kann. Zusätzlich könnte sich aber auch der hohe AB-Serumzusatz störend im ELISA ausgewirkt haben. Dagegen zeigte sich bei der IL4-Produktion nach PHA-Stimulation wie im Falle von IFNγ ein sehr früher Anstieg in beiden Blutspendergruppen (Maximalwert 90,34pg/ml nach 24h). Die Steigerung der IL4-Produktion nach Tetanus Toxoid-Stimulation ging langsamer vonstatten (Maximalwert 21,23pg/ml

nach 144h). Die Gesamtmenge an IL4 war aber deutlich niedriger als die produzierte IFNγ-Menge. Die IL4-Produktion war ebenfalls nach Stimulation mit $NiSO_4$ sehr gering, die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender zeigten aber einen leichten Anstieg der IL4-Produktion bis zum Zeitpunkt 120h (5,48pg/ml vs 2,55pg/ml). Auch die IL12p70-Produktion war bei den PBMC der Nickel-allergischen Blutspendern im Vergleich zu den nicht-allergischen Personen am Anfang der Kultur leicht erhöht (3,72pg/ml vs 2pg/ml nach 4h). Insgesamt zeigten sich aber in den ELISA-Ergebnissen keine deutlichen Unterschiede zwischen den Nickel-allergischen und den nicht-allergischen Blutspendern, so daß in den weiteren Untersuchungen das Hauptaugenmerk auf die molekularbiologischen Untersuchungen gelegt wurde (RT-PCR, Klonalitäts-Untersuchung). Die Ergebnisse aus der RT-PCR und der Klonalitätsuntersuchung, sowie die Proliferationsdaten aus diesen Versuchen decken sich dabei mit publizierten Ergebnissen, die T-Zellen mit einem Th1-Zytokinmuster für die Ausbildung eines Kontaktekzems verantwortlich machen [29,67].

5.5 Oligoklonalität in PBMC Nickel-allergischer Blutspender nach In-vitro-Stimulation

Selbst wenn hohe Nickel- oder Kobaltkonzentrationen im Zellkulturversuch und vermutlich auch in periimplantärem Gewebe eher toxisch und immunsuppressiv sind [61,99,116,143], so kann eine geringere Exposition direkt Adhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1 auf dem vaskulären Endothel induzieren und somit die Bereitstellung proinflammatorischer Zellen begünstigen [45]. In allergischen Personen können bereits geringe Nickelmengen Kontaktekzeme provozieren [46,85]. Eine spezifische T-Zellreaktivität kann einerseits durch den Lymphozytentransformationstest anhand der PBMC [28,66,115], oder anhand von Zellen gezeigt werden, die aus Hauttest-Arealen gewonnen werden [141]. In Analogie hierzu zeigten die in dieser Versuchsserie verwendeten PBMC der Nickel-allergischen Blutspender in vitro unter Nickelexposition eine signifikant höhere Proliferationsantwort im Vergleich zu den PBMC der nicht-allergischen Blutspender (SI = 8,32 vs 0,86). Patienten, die Ekzeme aufgrund einer hämatogenen Nickelexposition entwickeln, scheinen ebenfalls eine höhere Anzahl an zirkulierenden Nickel-spezifischen T-Zellen zu besitzen [123]. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt über MHC Klasse II-Moleküle [67,114]. Nickel-spezifische T-Zellen sind entweder CD4+ oder CD8+ [28,66,88] und produzieren Th1-Zytokine (IL-2, IFNγ), Th2-Zytokine (IL-4, IL-5) oder auch vorwiegend IL-10 [28,67,142]. Ausserdem gibt

es Arbeiten, die zeigen, daß die T-Zellen Nickel-allergischer Personen ein begrenztes T-Zell-Rezeptor-(TZR)β Repertoire exprimieren [141]. Zusätzlich wurde eine bestimmte Aminosäuresequenz in der TZR BV17-Kette gefunden, die für die Nickel-Erkennung wichtig ist [133], wobei die Aminosäure Histidin als Bindungsstelle für das Nickelion vermutet wird. Wenn nun eine (Antigen-)spezifische T-Zellantwort in vitro nach Stimulation erfolgt, ist nicht eine polyklonale pan-T-Zell-Proliferation sondern eine oligoklonale Expansion der entsprechenden spezifischen T-Zell-Population zu erwarten. Wenn auch das TZRαβ-Heterodimer vorwiegend bei der Nickelreaktion beteiligt ist, so sind doch unter den Nickel-induzierten Lymphoblasten 2% T-Zellen, die das TZRγδ-Heterodimer an der Zelloberfläche besitzen. Das zeigt, daß auch die γδ+ Zellen durch Nickel aktiviert werden. Diese Zellen könnten bei der Initiierung der zellulären Antwort eine Rolle spielen [113].

So untersuchten wir über einen zusätzlichen Weg, ob die beschränkte Benutzung des T-Zell-Rezeptors von Nickel-stimulierten PBMC in einer oligoklonalen T-Zell Expansion endet, die durch eine Analyse des Gen-Rearrangements sichtbar gemacht wird. Obwohl 98-99% der menschlichen T-Zellen den αβ-Phänotyp des TZR besitzen und nur 1-2% γδ-T-Zellen sind, wird doch der γ-Genort unabhängig von der TZR-Expression häufiger rearrangiert als der β-Genort. Der β-Genort bleibt meist in der Keimbahnkonfiguration [119]. MacDonald und Wilson schlugen ein angepasstes Modell vor mit einer Entscheidung zugunsten entweder der αβ- oder der γδ-Linie vor dem TZR Rearrangement [78]. Während der Reifung schützt der αβ- oder der γδ-TZR die jeweils zugehörigen Zellinien. Die β-, γ- und δ-Gene des TZR ordnen sich auf eine ähnliche Art und Weise in den festgelegten Vorläuferzellen beider Zellinien. Deshalb findet man γδ-Gene auch in αβ-T-Zellen und umgekehrt.

Eine durch Überrepräsentation der TZR Vβ-Elemente angezeigte klonale Expansion wurde nicht nur bei Nickel-allergischen Personen [133,134,141], sondern auch für das Allergen „Paraphenylendiamin“ bei entsprechend Sensibilisierten gefunden [111]. Durch die Klonalitätsanalyse konnte man auch eine oligoklonale Anhäufung von T-Zellen in Biopsien bei Patienten mit atopischem Ekzem sehen. Dies wurde als Ausdruck einer Antigen- (Allergen-) induzierten Ekzementstehung interpretiert [117]. Im Falle der Nickel-reaktiven Klone schlossen Vollmer et al. eine unspezifische T-Zell-Aktivierung im Sinne von superantigenartigen Effekten aus, da die spezifische Kombination von α- und β-Ketten für die Nickelreaktivität benötigt wurden [134]. Wir benutzten die TZRγ-

Kette in Analogie zu der in der Lymphomdiagnostik verwendeten Methode [52] für unsere Klonalitäts-Untersuchung, da diese eine weniger komplizierte Genomorganisation besitzt. In diesem Fall werden ebenfalls die αβ-tragenden T-Zell-Populationen erfasst, die ein TZRγ-Rearrangement aufweisen.

Wir fanden teils mono- aber auch oligoklonale T-Zell-Expansion in den Nickel-stimulierten PBMC der Nickel-allergischen Blutspender. Die wenigen Fälle, bei denen unterschiedliche TZRγ-Spezifitäten bei der selben Person in Abhängigkeit von den verschiedenen zur Stimulation verwendeten Nickelkonzentrationen auftraten, kann auf einer unvollständigen Äquivalenz zwischen der TZRαβ Oberflächenspezifität und der TZRγ Genanordnung beruhen. Sofern wir klonale Banden bei den nicht-allergischen Blutspendern gefunden hatten, so lag immer eine breite, die gesamte Serie der TZRγ-Familien abdeckende Reihe vor. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten zeigen unsere Ergebnisse, daß Nickel-stimulierte T-Zellen Nickel-allergischer Blutspender eine heterogene, aber doch selektive TZR-Gruppe an der Oberfläche exprimieren [133,142]. Eine Interpretation dieser Ergebnisse sollte aber auch immer das klinische Bild mit einbeziehen. Zur Frage einer Spättyp-Überempfindlichkeitsreaktion auf Metalle kann auch eine kombinierte Analyse der T-Zellklonalität und der Mediatorproduktion, mit Hilfe der RT-PCR oder ELISA-Technik, Zusatzinformationen liefern [125]. Unter 5.7.2 haben wir dies am Beispiel der Analyse von periimplantärem Gewebe im Hinblick auf spezifische zelluläre Immunreaktionen zur Frage „Verdacht auf Metallimplantatallergie“ diskutiert.

5.6 Analyse der PBMC nach Stimulation in vitro mittels Durchflusszytometrie

Meist wird das allergische Nickel-Kontaktekzem als eine typische Typ IV-Reaktion vom verzögerten Typ angesehen, die die Proliferation nickelspezifischer T-Zellen beinhaltet und haupsächlich durch CD4+ T-Zellen vermittelt wird [51]. Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß CD8+ T-Zellen bei der Pathogenese der Nickel-Allergie eine Rolle spielen [28]. Auch wurde eine zytotoxische T-Zellreaktion von Nickel-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen gegenüber Keratinozyten gesehen [127]. Die Art der Zytokine, die durch die nickelspezifischen T-Zellen produziert werden, kontrollieren dabei die Ausbildung des Kontaktekzems. Am Mausmodell wurde dabei ein Unterscheidungssystem eingeführt, dass anschließend auf die humanen T-Zellen übertragen wurde [31]. Die Th1-Zellen produzieren dabei vorwiegend IL2 und IFNγ und

die Th2-Zellen dagegen v.a. IL4 und IL5. Th0-Zellen dagegen produzieren Th1- (IFNγ) und Th2- (IL4) Zytokine [59,95]. Dabei spielt IFNγ eine wichtige Rolle bei der Verstärkung der Antigenpräsentation, indem es die Expression der Klasse II MHC-Moleküle und anderer kostimulatorischer Moleküle (B7-Familie) nach oben reguliert. Zusätzlich führt IFNγ zu einer gesteigerten IL12-Produktion von Makrophagen, das wiederum über einen Feedback-Mechanismus zu einer gesteigerten IFNγ-Produktion führt. IL2 agiert als Wachstumsfaktor und ist für die Expansion der antigenspezifischen T-Zellen verantwortlich. Ausserdem erhöht IL2 auch die Zytokinproduktion der T-Zellen. IL12 bindet an Rezeptoren auf antigenstimulierten CD4+ T-Zellen und fördert dort die Entwicklung der Zellen in eine Th1-Richtung [2]. Ebenso stimuliert IL12 auch direkt die Transkription der Th1-Gene (v.a. IFNγ) über die Aktivierung des STAT4 Proteins. IFNγ dagegen, das von Th1-Zellen produziert wird, inhibiert die Proliferation von Th2-Zellen und führt so zu einer vorherrschenden Th1-Dominanz.

IL4 dagegen führt zu einer Differenzierung der antigenstimulierten T-Zellen in Richtung Th2, was über die Aktivierung von STAT6 vermittelt wird. STAT6 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von IL4 und möglichen anderen Th2-Zytokinen unterstützt. Da differenzierte Th2-Zellen die Hauptquelle für das IL4 während der Immunantwort gegen Proteinantigene darstellt, stellt sich nun die Frage woher das IL4 vor der Th2-Zellentwicklung stammt. Vermutlich produzieren antigenstimulierte T-Zellen geringe IL4 Mengen ab der initialen Aktivierung. Ist das Antigen über einen längeren Zeitraum und in einer hohen Konzentration vorhanden, steigt die lokale IL4-Konzentration langsam an. Wenn das Antigen währenddessen keine Entzündung mit einer einhergehenden IL12-Produktion verursacht, dann differenzieren sich immer mehr T-Zellen zum Th2-Typ [2]. TNFα führt an den Endothelzellen der Blutgefäße zur Expression verschiedener Adäsionsmoleküle und sorgt dadurch für die fortlaufende Auswanderung der Effektorzellen zum Ort der Antigenexposition. Der IL2-Rezeptor (CD25) wird ebenfalls auf aktivierten T-Zellen exprimiert und ist ein Marker für eine antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen. In unseren Ergebnissen wird deutlich, daß die Aktivierung der nickelspezifischen T-Zellen nach 3 Tagen über IL2 bereits angelaufen ist. So zeigen die PBMC der Nickel-allergischen Blutspender eine signifikante Steigerung der IL2-Expression gegenüber den PBMC der nicht-allergischen Personen nach 72h (19,7% vs 2,96%). Die Expression von IL4 ist bei den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender um

5,11%, die Expression von IFNγ um 5,08%, sowie die TNFα-Expression um 7,03% gegenüber dem Leerwert (Stimulation mit Medium alleine) erhöht. Die PBMC der nicht-allergischen Blutspender zeigten in diesen Fällen eine geringere Expressionsänderung. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Teilweise verstärkten sich die Unterschiede in der Expression zum Ende der Stimulation nach 144h hin weiter (IFNγ, TNFα). Zusätzlich trat nach 144h ein signifikanter Unterschied in der IL12p70-Expression zwischen den PBMC der Nickel-allergischen Blutspender und den nicht-allergischen Personen auf (19,71% vs 4,7%). Ausserdem sank die Expression des CD25 der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender nach 144h deutlich (-23,61%). CD25 ist ein wichtiger Marker für regulatorische T-Zellen. Unser Ergebnis könnte damit ein Hinweis für eine verminderte Gegenregulation der Immunantwort bei den Nickel-allergischen Blutspendern im Laufe der Kultur sein. Zusammengefasst zeigen die Daten der Durchflusszytometrie im Falle der PBMC der Nickel-allergischen Blutspender in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten eine deutliche Th1-Antwort gegenüber der Exposition mit $NiSO_4$ [115,142].

5.7 Gewebeuntersuchungen

5.7.1 Biopsien aus Nickel-Epikutantestarealen

Das allergische Kontaktekzem, das beim Epikutantest durch die Applikation des Allergens auf dem Rücken induziert wird, wird durch allergenspezifische T-Zellen vermittelt, die aus den Blutgefäßen an den Ort der Allergenexposition auswandern. Im Fall von Nickel ist es bekannt, daß Nickel durch spezifische T-Zellklone über MHC Klasse II Moleküle erkannt wird [67,115]. In unserem Fall ließen sich die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen der PBMC gut auf die Klonalitätsanalyse der ECT-Biopsien übertragen. Auch hier zeigten die Hautstanzen der Nickel-Allergiker aus dem Nickel-Testfeld deutlich mehr oligoklonale T-Zellinfiltrate als die Kontrollhaut (Biopsien aus klinisch nicht reagierender Haut). Wie auch für die Analyse der PBMC-Zellkultur unter Nickelexposition diskutiert, wird die Mehrzahl der T-Lymphozyten den TZRαβ an der Oberfläche tragen. Allerdings läßt sich, wie unter 5.5 (S. 109) angeführt, wegen der genomischen TZRγ-Expression und des stattgefundenen Rearrangements auch über die TZRγ-Analyse ein Rückschluß auf klonale Expansionsmuster ziehen. So ergibt der Blick auf die Nickel-induzierten Ekzemherde in der Klonalitätsanalyse Hinweise auf eine gerichtete T-Zell Expansion. Auffällig ist

aber, daß auch 2 von 4 Biopsien aus reaktionslosen Nickel-Epikutantestfeldern ein oligoklonales Muster der TZRγ-Familie 2 zeigten. Aufgrund der kleinen Fallzahl muß diese Konstellation vorsichtig interpretiert werden: Kann es überhaupt sein, daß T-Zellen auch in der klinisch nicht reagierenden Haut vorhanden sind? Ist sogar eine gerichtete Expansion dieser Zellen in der Nickel exponierten, aber nicht reagierenden Haut möglich? S. Hackenberg hat kürzlich in seiner Dissertationsarbeit ein hierzu passendes Phänomen beschrieben [54]. Er führte immunhistologische Untersuchungen von Nickel-Epikutantestarealen durch. Er fand in den Biopsien aus „positiven" Epikutantestreaktionen (d.h. bei mit Ekzem reagierenden Nickel-allergischen Personen) dichte lymphozytäre Infiltrate. Geringe T-zelluläre Infiltrate zeigten sich aber auch in den klinisch reaktionslosen Nickel-Epikutantest-Arealen (Patienten ohne Nickelallergie). Letztere Konstellation sah er als möglichen Hinweis auf regulatorische T-Zellen [54]. So wäre auch bei unserer Untersuchung – mit Einbeziehen der kleinen Kontrollstanzen-Fallzahl – zu diskutieren, ob die teils gesehene T-Zellklonalität in den „Kontroll"-Biopsien auch auf eine Population an antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen zurückzuführen sein kann. Entsprechende Hinweise finden sich auch in kürzlich publizierten Untersuchungen [29]. Hinweise darauf liefern auch die unter 4.7 (S. 84) beschriebenen Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse Nickel-stimulierter PBMC von nicht-allergischen Kontrollen. Hier blieb die CD25-Expression der T-Zellen während der Kultur unter Nickel-Exposition konstant, während die Expression in der Kultur von PBMC Nickel-allergischer Blutspender deutlich abnahm. Dies könnte ein Hinweis auf eine Population regulatorischer T-Zellen bei den nicht-allergischen Kontrollen sein. Auch wenn die Klonalitätsanalyse nur einen Teilaspekt für die Analyse einer T-zellulären Antigenreaktion liefert, so könnte dies auch für die Beurteilung von periimplantärem Gewebe (hier um Hüftendoprothesen) dienen. Ein oligoklonales Infiltrat würde auch hier einen Hinweis auf eine antigenspezifische Immunreaktion liefern. Und so könnte diese Reaktion auch Ausdruck einer Überempfindlichkeit gegenüber einem Metallbestandteil des Implantates sein. Dementsprechend wurden die im Folgenden diskutierten Untersuchungen durchgeführt.

5.7.2 Periimplantäres Gewebe

In der Vergangenheit wurde immer wieder über Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Implantaten berichtet. Diese können auftreten, wenn sich eine spezifische

Sensibilisierung gegenüber Legierungskomponenten ausbildet oder wenn bereits vor Implantateinbringung eine Metallallergie besteht. Die Reaktionen wurden als lokalisierte oder generalisierte Ekzeme, Urtikariaschübe, persistierende Schwellung, sterile Osteomyelitis oder auch als Fälle von aseptischer Implantatlockerung beschrieben [25,33,49,56,58,73,81,89,99]. Die Legierungen, die für chirurgische und orthopädische Implantate verwendet werden, enthalten zu einem großen Teil klassische Kontaktallergene wie Nickel, Chrom oder Kobalt, aber auch Acrylate oder antibiotische Zusätze in Knochenzementen sind mögliche Allergieauslöser. Trotz der allgemein hohen Sensibilisierung in der Bevölkerung gegenüber Nickel (bis zu 12%) und Kobalt sowie Chrom (bis zu 5%) gibt es nur wenige beschriebene Implantatallergiefälle. Dies beruht vermutlich auf der schwierigen Beweisführung in einem derartigen Fall, da nur selten mehrere Diagnostikschritte (Epikutantest, Analyse von periimplantärem Gewebe, Ausschluß von Infekt oder mechanischem Versagen) vorliegen und ein Sistieren der Problematik nach Revisionsoperation in Zusammenschau aller Befunde zur Diagnose einer Implantatallergie führen. Bei einem Teil von Patienten mit komplikationsbedingten Revisionsoperationen konnten periimplantäre entzündliche Infiltrate mit den Charakteristika von Spättyp-Überempfindlichkeitsreaktionen gefunden werden [121,144].

Nickel- und Kobaltionen können an Gefäßendothelien direkt Adäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) induzieren [45]. So wird eine Rekrutierung proinflammatorischer Zellen ermöglicht. Aktivierte Monozyten und Makrophagen unterstützen die unspezifische Entzündung. Die Produktion von IL6 und IL1 wird auch im Hinblick auf Osteoklastenstimulierung, Knochenresorption und den Gewebeumbau genauer untersucht [16,44,47,99]. Eine erhöhte IL8-Expression wird ebenfalls mit der aseptischen Lockerung von Hüftendoprothesen in Verbindung gebracht [74]. Auch eine Freisetzung von Abriebpartikeln rund um das Implantat könnte systemische Wirkungen haben. So wurde über eine Anreicherung von Kobalt-, Chrom- und Titanpartikel in regionalen Lymphknoten und auch in der Leber bereits berichtet [128,145]. Die Autoren spekulieren über immunmodulierende Effekte der Partikeldisseminierung, Daten fehlen jedoch. Ebensowenig gibt es bisher Hinweise auf kanzerogene Effekte bei diesen Patienten.

Im Lymphozytentransformationstest zeigen PBMC von nickelallergischen Patienten bei Stimulation mit Nickelionen eine spezifische Proliferationsantwort. Dies gibt Hinweis auf eine T-zellvermittelte Reaktion [22,142]. Ein zusätzliches Zeichen ist die

Sekretion des Th1-Zytokins IFNγ als ein von Memory-T-Zellen produziertes Aktivierungssignal für Monozyten/Makrophagen.

Es existieren kaum Untersuchungen im Hinblick auf überschießende Immunreaktionen bzw. Überempfindlichkeitsreaktionen im Sinne einer Implantatallergie im periimplantären Gewebe bei Implantat-Unverträglichkeitsreaktionen. Eine Veröffentlichung beschrieb, daß Makrophagen und Fibroblasten im periimplantären Gewebe Il-6 produzieren und damit zur Osteolyse des umgebenden Knochen beitragen [70]. Eine andere Untersuchung betraf die Genexpression antiinflammatorischer Mediatoren (IL4, IL10 und TGFβ) in periimplantärem Gewebe, das bei Revisionsoperationen gewonnen worden war. Hier wurde eine Expression von IL4, IL10, sowie TGFβ periimplantär gefunden [90].

Uns standen 2 Serien von Gewebeproben zur Verfügung. Die erste Serie bestand aus 17 periimplantären Gewebeproben, von denen 12 bei Revisionsoperationen gewonnen worden waren. Diese waren aufgrund einer aseptischen Lockerung des Implantates nötig geworden. 5 Proben stammten von Patienten, die erstmalig eine Hüftgelenks-Endoprothese wegen fortgeschrittener Arthrose erhielten. Die Klonalitäts-Untersuchung zeigte deutlich, daß in den Proben aus Revisionsoperationen wesentlich mehr oligoklonale Infiltrate vorhanden waren, als in den Proben aus zur Implantation vorgesehenen Arealen. Dabei war v.a. die TZRγ-Familie 11 dominierend. Dies ist insofern interessant, da sich in den Biopsien aus Epikutantestfeldern oligoklonale Infiltrate mit einer Expression dieser TZRγ-Familie nicht zeigten. Da diese aber von anderen Patienten stammten, kann man hier keine Vergleiche anstellen. Ebenso zeigte die RT-PCR in 11/12 der Revisions-Proben ein deutliches Th1-Muster mit einer starken IFNγ-Expression. Demgegenüber war nur bei Gewebearealen vor Implantation (3/5) eine IL4-Expression als Hinweis auf eine Th2-dominierte Entzündung zu sehen. Dies könnte auch als Hinweis auf eine fehlende „Überempfindlichkeits“- oder „Fremdkörper“-Reaktion in Abwesenheit von Implantatmaterial gewertet werden. Zwar wurde auch eine Epikutantestung zur Frage „Metallallergie“ bei den Patienten angestrebt, dies konnte aber leider größtenteils nicht durchgeführt werden. So kann im Überblick nicht angegeben werden, wie häufig möglicherweise eine Metallallergie bei diesen Patienten bestand bzw. welche Patienten auch im Epikutantest „Überempfindlichkeiten“ aufwiesen. Leider muß diese Frage in der vorliegenden Arbeit unbeantwortet bleiben.

Die zweite Probenserie mit 13 kleinen Gewebeproben wurde uns zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung gestellt für eine mögliche Gewichtung des Zytokin-Entzündungsmusters mittels RT-PCR. Eine parallele Klonalitätsanalyse konnte leider wegen der jeweils sehr kleinen Proben nicht durchgeführt werden. Die Proben stammten von Patienten, die ebenfalls eine Revisionsoperation aufgrund einer aseptischen Lockerung erhalten hatten. Dabei wurden die Gewebeproben während der Operation an unterschiedlichen Stellen entnommen („Pseudokapsel“, „distales Interface“, „proximales Interface“). Es zeigten sich bei der quantitativen RT-PCR keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die Lokalisation der Gewebeproben. Insgesamt waren erhöhte IL6-, IL8- und E-Selektin-Expressionen in den Gewebeproben zu sehen. Dies läßt sich als Entzündungsphänomen mit erhöhter Zellrekrutierung interpretieren. Andererseits weist die hohe TGFβ-Expression in allen Proben auf gegenregulatorische Mechanismen hin. Bei 2 Gewebeproben deutet die hier spezielle Zytokinkonstellation (mäßige IL4- sowie hohe IL10- und Foxp3-Expression) auf eine eher entzündungsunterdrückende, dem Th2-Muster ähnelnde Konstellation, hin. Insgesamt läßt sich also auch am periimplantären Gewebe eine Zytokin- bzw TZRγ-Klonalitätsanalyse durchführen. Allerdings benötigen diese Analysedaten, speziell wenn ein heterogenes Patientengut vorliegt, noch weitere Informationen zur klinischen Wertung. Leider lagen uns zu diesen Patienten keine näheren Angaben über Allergieanamnese vor und es konnte auch kein Epikutantest durchgeführt werden sowie weitere Aspekte der Gewebeanalyse, wie beispielsweise Immunhistologie. Daß bei Zusammenschau dieser verschiedenen Informationen weiterführende Aussagen möglich sind, sollen zwei Beispiele erläutern:

- Bei einem 37 jährigen Patienten mit osteosynthetisch versorgter Unterarmfraktur und Wundheilungsstörung sowie ausbleibender Frakturheilung hatte sich eine Chromallergie gezeigt und eine im periimplantären Gewebe vorherrschende IFNγ-Expression zusammen mit dichtem T-Zellinfiltrat. Dieses war klonal expandiert. Nach Materialwechsel erfolgte eine Frakturheilung. Hier wurde eine Chromallergie-assoziierte Metallimplantatunverträglichkeit gesehen [125].
- Bei einem 60 jährigen Patienten waren wiederholt Schmerzen und Lockerung mit ausgeprägter Ergußbildung bei einer Metall-Metall (Cr-Co)-Hüft-Endoprothese aufgetreten. Die Epikutantestung war unauffällig. Im Rahmen der Revisionsoperation gewonnenes Gewebe zeigte dichte T-lymphozytäre

Infiltrate vornehmlich vom Memory-Typ ($CD45RO^+$) zusammen mit starker IFNγ-Expression (und fehlender IL10-Expression) bei Klonalitätsnachweis (TZRγ Familie 2). Zusätzlich konnten aus periimplantärem Gewebe Cobalt-reaktive T-Zellen isoliert werden [122]. Nach Revisionsoperation wurde eine Titanendoprothese komplikationslos vertragen. Hier wurde in Zusammenschau der Befunde eine Cobalt-assoziierte Metallimplantatunverträglichkeit angenommen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden die Möglichkeiten geschaffen, weitere Charakteristika von Metall (Nickel) assoziierter Überempfindlichkeit zu erkennen und in Zusammenschau mehrerer Analyseschritte auch für zukünftige interdisziplinäre Untersuchungen bei Patienten mit Verdacht auf Metallimplantatunverträglichkeit einzusetzen.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden In-vitro-Charakteristika der Nickelkontaktallergie hinterfragt. Die Untersuchungen wurden an aus Blutproben isolierten Monozyten und Lymphozyten (PBMC) von insgesamt 45 Personen (27 mit, 18 ohne Allergie) und an Biopsien aus Nickelepikutantest-Arealen von 14 Personen (10 mit, 4 ohne Allergie) durchgeführt. Weiter standen 30 periimplantäre Gewebeproben von Hüft-TEP-Revisionsoperationen zur Verfügung.

Für Monozyten waren im Vergleich zu Lymphozyten Nickel und Kupfer in Kombination stärker toxisch (Trypanblauexklusion). Lymphozyten reagierten empfindlicher als Monozyten auf die Kombination von Nickel und Chrom, sowie Kupfer und Zink; es gab auch synergistische Effekte. Insgesamt waren jedoch die PBMC Nickel-allergischer Personen gegenüber Nickel weniger empfindlich. Lymphozyten allergischer Personen zeigten unter Nickel-Exposition und anderen Metallionen auch weniger Apoptose (Annexin V-Färbung). So führte die Nickel-Kupfer-Zink Exposition (Euro-Eluat) zu maximal 4,9% Apoptoserate (Allergiker) gegenüber 17,7% (Kontrollpersonen).

Nickel als „Hapten“ benötigt vermutlich Proteinbindung zur Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten. So erwies sich auch bei vergleichender Stimulation mit Zusatz von 1% bzw. 10% humanem AB-Serum im Kulturmedium letztere Konstellation als ideal für eine Nickel-spezifische T-Zellaktivierung in vitro.

Die Aktivierung von dendritischen Zellen (DZ) gehört zur Bahnung kontaktallergischer Reaktionen. So wurden Monozyten-abgeleitete unreife DZ etabliert und hieran der Effekt einer Nickel-Exposition über Phänotypänderungen untersucht. Die Reifungsmarker CD83 sowie CD40 wurden nach einer Nickelstimulation bei DZ allergischer Spender im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollen stärker exprimiert (CD83: +30,11% vs –1,6%; CD40: +17,05 vs –17,00%). So schienen unreife Monozyten-abgeleitete DZ unter Nickel-Exposition weiter auszureifen, besonders bei einem „allergischen Blutspender-Status“.

Anschließend wurde die In-vitro-Stimulierbarkeit humaner PBMC von allergischen und nicht-allergischen Personen bei Nickelexposition anhand folgender Parameter untersucht: *Proliferation*; *klonale* (Antigen-spezifische) *T-Zellexpansion* (TZRγ-Rearrangementanalyse); *Zytokinproduktion* (IFNγ, IL2, IL4, IL12p70, TNFα; ELISA/Durchflußzytometrie). PBMC allergischer Blutspender proliferierten signifikant

nach Nickelexposition im Vergleich zu nicht-allergischen Kontroll-PBMC (mittlerer Stimulationsindex 27,86 vs 1,75). In 10/10 der Nickel-stimulierten Kulturen allergischer Blutspender ergab sich Oligoklonalität (Vorherrschen bestimmter TZRγ-Familien als Hinweis auf eine gerichtete Vermehrung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten). Parallel dazu zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine deutlich gesteigerte IL2-, sowie IL12-Expression der PBMC allergischer Blutspender (IL2: 19,70% vs 2,96%; IL12: 19,71% vs 4,70%). Die CD25-Expression als möglicher Hinweis für regulatorische T-Zellen nahm auf PBMC allergischer Blutspender unter Nickel-Exposition im Kulturverlauf vergleichsweise stärker ab (-23,61% vs –2,06%).

8/10 Biopsien aus Nickel-reaktiven Epikutantestfeldern (Nickelallergie mit Ekzemreaktion) zeigten oligoklonale T-Zellexpansion. Dies gibt Hinweise für eine Antigen-gerichtete (klonale) T-Zellexpansion. Die Rearrangementanalyse des TZRγ (im Genom parallel vorhanden) kann hier trotz meist TZRαβ-Oberflächenexpression genützt werden.

8/12 bei Hüft-TEP-Revisionsoperationen (aseptische Lockerung) gewonnene Gewebeproben zeigten ein klonales Infiltrat (aber nur 1/5 Proben aus zukünftigem Implantatlager). Durch eine Zytokinanalyse mittels RT-PCR (IL4, IL5, IFNγ, TNFα) konnte in 11/12 Revisionsoperations-Proben ein Th1-Muster mit einer starken IFNγ-Expression nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigten 3/5 der Kontrollgewebe eher Th2-typische Zytokine. Die Analyse weiterer 13 Gewebeproben durch quantitative RT-PCR (IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL13, IFNγ, TNFα, TGFβ, E-Selektin, Foxp3) ergab unterschiedliche Entzündungsmuster. So wurde in 2 Proben ein (entzündungslimitierendes) Th2-Muster mit einer mäßigen IL4-, sowie erhöhter IL10- und Foxp3-Expression gefunden. In 4 Proben war E-Selektin erhöht und IL10 erniedrigt als Ausdruck aktiver Entzündung mit möglicher Zellrekrutierung. Eine allergologische Wertung dieser Befunde kann wegen leider nicht durchführbarer Allergiediagnostik hier nicht erfolgen.

Zusammenfassend konnten also mit den beschriebenen Methoden In-vitro Charakteristika der Nickel-Kontaktallergie untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben die Voraussetzungen geschaffen, um in Zusammenschau mit klinischer Allergiediagnostik und zusätzlichen Methoden (z.B. Immunhistologie) weiterführende Studien, beispielsweise zur Abklärung von Implantat-unverträglichkeitsreaktionen, in Angriff nehmen zu können.

7 Abkürzungsverzeichnis

ΦX-174 HaeIII Digest	DNA-Größenstandard
96well	Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen
Ak	Antikörper
AKE	allergisches Kontaktekzem
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Kopierte Desoxyribonukleinsäure
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	delayed type hypersensitivity
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZ	dendritische Zelle
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
IFNγ	Interferon-γ
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTT	Lymphozytentransformationstest
LW	Stimulation mit Medium (Kontrolle)
MACS	Magnetic activated cell sorting
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NFkappaB	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTP	Nukleotidtriphosphat
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PWM	Mitogen der Phytolaccarot-Pflanze
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
T_a	Annealing-Temperatur
TEP	Total-Endoprothese
TGF	Tumor growth factor
Th1 / Th2	T-Helfer-Zellen vom Typ 1 / Typ 2
TNFα	Tumor Nekrosis Faktor alpha
TT	Tetanus Toxoid
TZR	T-Zell-Rezeptor
Vγ2, Vγ9, Vγ10, Vγ11	TZR-Familie 2, 9, 10, 11

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 Ludwig-Maximilians-Universität 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. Rueff bedanken.

Mein herzlichster Dank geht an Frau S. Maier, der Technischen Assistentin des Allergologielabors, für die unermüdliche Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Herrn PD Dr. C. Sander danke ich für die Einarbeitung in die Klonalitätsanalyse sowie die Begutachtung der Ergebnisse.

Für die Zusammenarbeit und die Kenntnis über die Generierung Monozyten-abgeleiteter dendritischer Zellen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Röcken sowie Herrn Dr. K. Ghoreschi herzlicht bedanken.

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen von Kongressberichten veröffentlicht:

Summer B, Ghoreschi K, Barnsorf S, Przybilla B, Thomas P. Phenotype differences in monocyte derived dendritic cells from nickel allergic and non allergic donors upon nickel exposure. In: Allergy Frontiers and Futures. Hogrefe & Huber, Göttingen 2004: 93-97

Summer B, Ghoreschi K, Barnsorf S, Roider G, Thomas P. PBMC of nickel allergic and non allergic individuals display different apoptotic threshold upon exposure to nickel and metal ions released by coins. Arch Dermatol Res 2004; 294/10-1: 462

9 Literaturverzeichnis

1. European Parliament and Council Directive 94/27/EEC. *Official Journal of the European Communities* 1994; **L188:** 1-2.

2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, eds. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1997: 250-276.

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

4. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281:** 1322-1326.

5. Agrup G. Sensitization induced by patch testing. *Br J Dermatol* 1968; **80:** 631-634.

6. Al-Tawil NG, Berggren G, Emtestam L, Fransson J, Jernselius R, Marcusson JA. Correlation between quantitative in vivo and in vitro responses in nickel-allergic patients. *Acta Derm Venereol* 1985; **65:** 385-389.

7. Al-Tawil NG, Marcusson JA, Möller E. Lymphocyte transformation test in patients with nickel sensitivity: an aid to diagnosis. *Acta Derm Venereol* 1981; **61:** 511-515.

8. Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Bergé S, Appel T, Geiger E, Kochan JP, Bieber T. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: A new Langerhans´ cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **112:** 141-148.

9. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 2001; **166:** 3837-3845.

10. Aspegren N, Rorsman H. Short-term culture of leukocytes in nickel hypersensitivity. *Acta Derm Venereol* 1962; **42:** 412.

11. Avnstorp C. Prevalence of cement eczema in Denmark before and since addition of ferrous sulfate to Danish cement. *Acta Derm Venereol* 1989; **69:** 151-155.

12. Barceloux DG. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; **37:** 173-194.

13. Barceloux DG. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; **37:** 217-230.

14. Barceloux DG. Nickel. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; **37:** 239-258.

15. Barceloux DG. Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; **37:** 279-292.

16. Black J. Allergic Foreign-Body Response. In: Black J, ed. *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. New York Basel: Marcel Dekker Inc; 1999: 215-233.

17. Blascho A. Die Berufsdermatosen der Arbeiter. Das Galvanisierekzem. *Dtsch Med Wochenschr* 1889; **15:** 925-927.

18. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 1995; **25:** 3006-3010.

19. Boysen M, Solberg LA, Andersen I, Hogetveit AC, Torjussen W. Nasal histology and nickel concentration in plasma and urine after improvements in the work environment at a nickel refinery in Norway. *Scand J Work Environ Health* 1982; **8:** 283-289.

20. Brasch J, Henseler T, Aberer W, Bauerle G, Frosch PJ, Fuchs T, Fünfstück V, Kaiser G, Liscka GG, Pilz B. Reproducibility of patch tests. A multicenter study of synchronous left-versus right-sided patch tests by the German Contact Dermatitis Research Group. *J Am Acad Dermatol* 1994; **31:** 584-591.

21. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. *Dermatologie und Venerologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer 2005.

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

23. Calnan CD, Bandmann HJ, Cronin E, Fregert S, Hjorth N, Magnusson B, Malten K, Meneghini CL, Pirila V, Wilkinson DS. Hand dermatitis in housewives. *Br J Dermatol* 1970; **82:** 543-548.

24. Calnan CD, Wells GC. Suspender dermatitis and nickel sensitivity. *Br Med J* 1956; **4978:** 1265-1268.

25. Carlsson A, Möller H. Implantation of orthopaedic devices in patients with metal allergy. *Acta Derm Venereol* 1989; **69:** 62-66.

26. Carlsson AS, Magnusson B, Möller H. Metal sensitivity in patients with metal-to-plastic total hip arthroplasties. *Acta Orthop Scand* 1980; **51:** 57-62.

27. Caron GA, Sarkany I, Williams HS, Todd AP, Gell HM. Radioactive method for the measurement of lymphocyte transformation in vitro. *Lancet* 1965; **2:** 1266-1268.

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

29. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 2000; **114:** 295-302.

30. Cederbrant K, Anderson C, Andersson T, Marcusson-Stahl M, Hultman P. Cytokine production, lymphocyte proliferation and T-cell receptor Vbeta expression in primary peripheral blood mononuclear cell cultures from nickel-allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; **132:** 373-379.

31. Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987; **138:** 3688-3694.

32. Christensen OB, Möller H. External and internal exposure to the antigen in the hand eczema of nickel allergy. *Contact Dermatitis* 1975; **1:** 136-141.

33. Coleman RF, Herrington J, Scales JT. Concentration of wear products in hair, blood, and urine after total hip replacement. *Br Med J* 1973; **1:** 527-529.

34. Coombs RR, Gell PG. The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs RR, Gell PG, eds. *Clinical aspects of immunology*. Philadelphia: Davis 1963: 317.

35. De Smedt AC, Van Den Heuvel RL, Zwi Berneman N, Schöters GE. Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+ derived DC by NiCl(2) and SDS. *Toxicol In Vitro* 2001; **15:** 319-325.

36. Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; **42:** 35-56.

37. Enk AH, Katz SI. Identification and Induction of Keratinocyte-Derived IL-10. *J Immunol* 1992; **149:** 92-95.

38. Everness KM, Gawkrodger DJ, Botham PA, Hunter JAA. The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an *in vitro* lymphocyte transformation test. *Br J Dermatol* 1990; **122:** 293-298.

39. Foti C, Seidenari S, Antelmi A, Bonamonte D, Conserva A, Angelini G. Provocative use test of 1 euro coin in nickel-sensitized subjects. *Contact Dermatitis* 2005; **52:** 167-168.

40. Fritsch P. *Dermatologie Venerologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer 2004.

41. Gawkrodger DJ. Nickel sensitivity and the implantation of orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis* 1993; **28:** 257-259.

42. Ghaemmaghami AM, Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clin Exp Allergy* 2002; **32:** 1468-1475.

43. Gimenez-Camarasa JM, Garcia-Calderon P, Asensio J, De Moragas JM. Lymphocyte transformation test in allergic contact nickel dermatitis. *Br J Dermatol* 1975; **92:** 9-15.

44. Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G, Shanbag AS. Bone-resorption activity of particulate stimulated macrophages. *J Bone Miner Res* 1993; **8:** 1071-1079.

45. Göbeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerdt S, Sorg C. 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 (ELAM-1) by endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1993; **100:** 759-765.

46. Goh CL. Prevalence of contact allergy by sex, race and age. *Contact Dermatitis* 1985; **14:** 237-240.

47. Goldring SR, Flannery MS, Person KK, Evins AE, Jasty MJ. Evaluation of connective tissue cell responses to orthopaedic implant materials. *Connect Tissue Res* 1990; **24:** 77-81.

48. Gomez J, Garcia-Domingo D, Martinez-A C, Rebollo A. Role of NF-kappaB in the control of apoptotic and proliferative responses in IL-2 responsive T cells. *Front Biosci* 1997; **2:** d49-60.

49. Goodman SB. Does the immune system play a role in loosening and osteolysis of total joint replacements? *J Long Term Eff Med Implants* 1996; **6:** 91-101.

50. Gordon PM, Buxton PK, McLaren KM, Aldridge RD. Sensitivity to sternotomy wires may cause postoperative pruritus. *Ann Thorac Surg* 1996; **61:** 1514-1516.

51. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunology today* 1998; **19:** 37-43.

52. Graf A, Kaudewitz P, Simon M, Kind P, Sander CA. Detection of clonality in cutaneous T-cell lymphomas by PCR analysis. *Pathologe* 1996; **17:** 446-450.

53. Granchi D, Ciapetti G, Savarino L, Cavedagna D, Donati ME, Pizzoferrato A. Assessment of metal extract toxicity on human lymphocytes cultured *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 1996; **31:** 183-191.

54. Hackenberg S. Immunhistologische Charakterisierung des Nickel-induzierten Kontaktekzems anhand von T-Zellinfiltrat, Adhäsionsmolekülen und Proliferations-/Apoptosephänomenen. *Dissertation* 2005.

55. Hallab NJ, Anderson S, Stafford T, Glant T, Jacobs JJ. Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2005; **23:** 384-391.

56. Hallab NJ, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg* 2001; **83-A(3):** 428-436.

57. Hallab NJ, Mikecz K, Vermes C, Skipor A, Jacobs JJ. Differential lymphocyte reactivity to serum-derived metal-protein complexes produced from cobalt-based and titanium-based implant alloy degradation. *J Biomed Mater Res* 2001; **56:** 427-436.

58. Hayashi K, Kaneko H, Kawachi S, Saida T. Allergic contact dermatitis and osteomyelitis due to sternal stainless steel wire. *Contact Dermatitis* 1999; **41:** 115-116.

59. Hentschel M, Kapp A, Renz H, Werfel T. Interleukin-4 production and selection of TCR-V(beta) elements by nickel-specific T-cells in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1996; **288:** 331.

60. Hierholzer S, Hierholzer G, Sauer KH, Paterson RS. Increased corrosion of stainless steel implants in infected plated fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 1984; **102:** 198-200.

61. Howie DW, Rodgers SD, McGee MA, Haynes DR. Biologic effects of cobalt chrome in cell and animal models. *Clin Orthop* 1996; **329:** 217-232.

62. Hutchinson F, Raffle EJ, MacLeod TM. The specificity of lymphocyte transformation in vitro by nickel salts in nickel sensitive subjects. *J Invest Dermatol* 1972; **58:** 362-365.

63. Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967; **99:** 1187-1198.

64. Johansson SG. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet* 1967; **2:** 951-953.

65. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of activating signal. *Immunol Today* 1999; **20:** 561-567.

66. Kapsenberg ML, Res P, Bos JD, Schootenmijer A, Teunissen MB, Van Schooten W. Nickel-specific T lymphocyte clones derived from allergic nickel-contact dermatitis lesions in man: heterogeneity based on requirement of dendritic antigen-presenting cell subsets. *Eur J Immunol* 1987; **17:** 861-865.

67. Kapsenberg ML, Wierenga EA, Stiekema FE, Tiggelman AM, Bos JD. Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J Invest Dermatol* 1992; **98:** 59-63.

68. Kaufman DB, DiNicola W, McIntosh RM. Acute potassium dichromate poisoning. *Am J Dis Child* 1970; **119:** 374-376.

69. Klaschka F, Ring J. Systemically induced (hematogenous) contact eczema. *Semin Dermatol* 1990; **9:** 210-215.

70. Konttinen YT, Xu JW, Waris E, Li TF, Gomez-Barrena E, Nordsletten L, Santavirta S. Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement. *Clin Exp Rheumatol* 2002; **20:** 485-490.

71. Konttinen YT, Zhao D, Beklen A, Ma G, Takagi M, Kiveli-Rajamaki M, Ashammakhi N, Santavirta S. The Microenvironment around Total Hip Replacement Prostheses. *Clin Orthop Rel Res* 2005; **430:** 28-38.

72. Koster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommerauer M, Kahler J, Baldus S, Meinertz T, Hamm CW. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet* 2000; **356:** 1895-1897.

73. Kubba R, Taylor JS, Marks KE. Cutaneous complications of orthopedic implants. A two-year prospective study. *Arch Dermatol* 1981; **117:** 554-560.

74. Lassus J, Waris V, Xu JW, Li TF, Hao J, Nietosvaara Y, Santavirta S, Konttinen YT. Increased interleukin-8 (IL-8) expression is related to aseptic loosening of total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; **120:** 328-332.

75. Lindahl M, Leanderson P, Tagesson C. Novel aspect on metal fume fever: Zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. *Human Exp Toxicol* 1998; **17:** 105-110.

76. Lindemann M, Böhmert J, Zabel M, Grosse-Wilde H. ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 2003; **33:** 992-998.

77. Linden JV, Hopfer SM, Gossling HR, Sunderman FW Jr. Blood nickel concentrations in patients with stainless-steel hip prostheses. *Ann Clin Lab Sci* 1985; **15:** 459-463.

78. MacDonald HR, Wilson A. The role of the T-cell receptor (TCR) in $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage commitment: clues from intracellular TCR staining. *Immunol Rev* 1998; **165:** 87-94.

79. Mayer D, Branscheid D. Exposure of human lung fibroblasts to ozone: cell mortality and hyaluronan metabolism. *J Toxicol Environ Health* 1992; **35:** 235-246.

80. McDonnell WF, Horstmann DH, Abdul-Salaam S, House E. Reproducibility of individual responses to ozone exposure. *Am Rev Respir Dis* 1985; **131:** 36-40.

81. McKenzie AW, Aitken CV, Ridsdill-Smith R. Urticaria after insertion of Smith-Petersen Vitallium nail. *Br Med J* 1967; **4:** 36.

82. McLeod TM, Hutchinson F, Raffle EJ. The uptake of labelled thymidine by leukocytes of nickel sensitive patients. *Br J Dermatol* 1970; **82:** 487-492.

83. Merritt K, Brown SA. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin Orthop* 1996; **329 Suppl:** S233-S243.

84. Mochida Y, Böhler M, Salzer M, Bauer TW. Debris From Failed Ceramic-on-Ceramic and Ceramic-on-Polyethylene Hip Prostheses. *Clin Orthop* 2001; **389:** 113-125.

85. Möller H. Nickel dermatitis: problems solved and unsolved. *Contact Dermatitis* 1990; **23:** 217-220.

86. Morgan LG, Usher V. Health problems associated with nickel refining and use. *Ann Occup Hyg* 1994; **38:** 189-198.

87. Mostardi RA, Pentello A, Kovacik MW, Askew MJ. Prosthetic metals have a variable necrotic threshold in human fibroblasts: An *in vitro* study. *J Biomed Mater Res* 2001; **59:** 605-610.

88. Moulon C, Wild D, Dormoy A, Weltzien HU. MHC-dependent and -independent activation of human nickel-specific CD8+ cytotoxic T cells from allergic donors. *J Invest Dermatol* 1998; **111:** 360-366.

89. Munro-Ashman D, Miller AJ. Rejection of metal to metal prosthesis and skin sensitivity to cobalt. *Contact Dermatitis* 1976; **2:** 65-67.

90. Nabae M, Inoue K, Ushiyama T, Hukuda S. Gene expression of antiinflammatory mediators in THR retrieved interfacial membranes. *Acta Orthop Scand* 1999; **70:** 149-154.

91. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. Washington, DC: National Academy of Sciences 1980.

92. Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, Otani T, Fujikawa K, Toyama Y, Hisamori N, Nozue A. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages. *Biomaterials* 2003; **24:** 1447-1457.

93. Novak N, Bieber T, Katoh N. Engagement of FcεRI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J Immunol* 2001; **167:** 797-804.

94. Prausnitz C, Küstner H. Studien über die Überempfindlichkeit. *Zbl Bakt* 1921; **I Orig. 86:** 160.

95. Probst P, Küntzlin D, Fleischer B. Th2-type infiltrating T cells in nickel-induced contact dermatitis. *Cell Immunol* 1995; **165:** 134-140.

96. Räsänen L, Tuomi ML. Diagnostic value of the lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupational coin dermatitis. *Contact Dermatitis* 1992; **27:** 250-254.

97. Riley MR, Bösewetter DE, Kim AM, Sirvent FP. Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. *Toxicology* 2003; **190:** 171-184.

98. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283:** 1183-1186.

99. Rodgers K, Klykken P, Jacobs J, Frondoza C, Tomazic V, Zelikoff J. Immunotoxicity of Medical Devices. *Fund Appl Toxicology* 1997; **36:** 1-14.

100. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology today* 1997; **18:** 263-266.

101. Rycroft RJG, Menne T, Frosch PJ, Lepoittevin JP. *Textbook of Contact Dermatitis*. Berlin Heidelberg New York: Springer 2001.

102. Sadler PJ, Tucker A, Viles JH. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni2+ and Cu2+ binding site of serum albumins. Comparison with Co2+, Cd2+ and Al3+. *Eur J Biochem* 1994; **220:** 193-200.

103. Salnikow K, Costa M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; **19:** 307-318.

104. Sandstead HH. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr* 1995; **61:** 621S-624S.

105. Schittenhelm A, Stockinger W. Anaphylaxiestudien bei Mensch und Tier, IV. Mitteilung. Über die Idiosynkrasie gegen Nickel ("Nickelkrätze") und ihre Beziehung zur Anaphylaxie. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin* 1925; **XLV:** 58-74.

106. Schnuch A, Geier J, Lessmann H, Uter W, Brasch J, Frosch PJ. Kontaktallergene im aktuellen Zeitverlauf. *Allergo J* 2004; **13:** 57-69.

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

108. Schubert H, Berova N, Czernielewski A, Hegyi E, Jirasek L, Kohanka V, Korossy S, Michailov P, Nebenführer L, Prater E. Epidemiology of nickel allergy. *Contact Dermatitis* 1987; **16:** 122-128.

109. Schulz K, Fuchs T. *Manuale allergologicum*. München Deisenhofen: Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle 1990.

110. Shounan Y, Feng X, O`Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998; **217:** 61-70.

111. Sieben S, Kawakubo Y, Al Masaoudi T, Merk HF, Blomeke B. Delayed-type hypersensitivity reaction to paraphenylendiamine is mediated by 2 different pathways of antigen recognition by specific alphabeta human T-cell clones. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109:** 1005-1011.

112. Silvennoinen-Kassinen S. Lymphocyte transformation in nickel allergy: amplification of T-lymphocyte responses to nickel sulphate by macrophages in vitro. *Scand J Immunol* 1980; **12:** 61-65.

113. Silvennoinen-Kassinen S, Ikaheimo I, Karvonen J, Kauppinen M, Kallioinen M. Mononuclear cell subsets in the nickel-allergic reaction in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 1992; **89:** 794-800.

114. Sinigaglia F. The molecular Basis of Metal Recognition by T Cells. *J Invest Dermatol* 1994; **102:** 398-401.

115. Sinigaglia F, Scheidegger D, Garotta G, Scheper R, Pletscher M, Lanzavecchia A. Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J Immunol* 1985; **135:** 3929-3932.

116. Sundermann FW. A pilgrimage into the archives of nickel toxicology. *Ann Clin Lab Sci* 1989; **19:** 1-16.

117. Tanaka A, Takahama H, Kato T, Kubota Y, Kurokawa K, Nishioka K, Mizoguchi M, Yamamoto K. Clonotypic analysis of T cells infiltrating the skin of patients with atopic dermatitis: evidence for antigen-driven accumulation of T cells. *Hum Immunol* 1996; **48:** 107-113.

118. Tantral L, Malathi K, Kohyama S, Silane M, Berenstein A, Jayaraman T. Intracellular calcium release is required for caspase-3 and -9 activation. *Cell Biochem Funct* 2004; **22:** 35-40.

119. Theodorou I, Raphael M, Bigorgne C, Fourcade C, Lahet C, Cochet G, Lefranc MP, Gaulard P, Farcet JP. Recombination pattern of the TCR gamma locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol* 1994; **174:** 233-242.

120. Thomas P. Allergien durch Implantatwerkstoffe. *Orthopäde* 2003; **32:** 60-64.

121. Thomas P. Allergologische Aspekte der Verträglichkeit von Biomaterialien. *Biomaterialien* 1999; **1:** 1-5.

122. Thomas P, Schöberl A, Summer B, Jakob K, Maier S, Przybilla B. Periimplantar Cobalt-Specific Delayed Type Hypersensitivity Reaction in a Patch Test Negative Patient With Failure of Hip Arthroplasty. *zur Veröffentlichung eingereicht* 2005.

123. Thomas P, Holz T, Messer G, Przybilla B. Nickel allergic patients with or without reactions upon oral nickel challenge: lymphocyte reactivity and cytokine pattern. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103:** 85.

124. Thomas P, Rueff F, Przybilla B. Cheilitis due to nickel contact allergy in a trumpet player. *Contact Dermatitis* 2000; **42:** 351-352.

125. Thomas P, Summer B, Sander CA, Przybilla B, Thomas M, Naumann T. Intolerance of osteosynthesis material: evidence of dichromate contact allergy with concomitant oligoclonal T-cell infiltrate and TH1-type cytokine expression in the peri-implantar tissue. *Allergy* 2000; **55:** 969-972.

126. Tian L, Lawrence DA. Metal-induced modulation of nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; **141:** 540-547.

127. Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A. Disparate Cytotoxic Activity of Nickel-Specific CD8+ and CD4+ T Cell Subsets Against Keratinocytes. *J Immunol* 2000; **165:** 3058-3064.

128. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc´h M. Dissemination of Wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement. *J Bone Joint Surg* 2000; **82-A:** 457-477.

129. Valko M, Morris H, Cronin T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; **12:** 1161-1208.

130. Van Hoogstraten IM, Andersen KE, Von Blomberg BM, Boden D, Bruynzeel DP, Burrows D, Camarasa JG, Dooms-Goossens A, Kraal G, Lahti A. Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. *Clin Exp Immunol* 1991; **85:** 441-445.

131. Van Mörbeke D. *European Allergy White Paper*. UCB Institute of Allergy, Belgien: Braine-L´Alleud 1997.

132. Veien NK. Ingested food in systemic allergic contact dermatitis. *Clin Dermatol* 1997; **15:** 547-555.

133. Vollmer J, Fritz M, Dormoy A, Weltzien HU, Moulon C. Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity. *Eur J Immunol* 1997; **27:** 1865-1874.

134. Vollmer J, Weltzien HU, Moulon C. TCR Reactivity in Human Nickel Allergy Indicates Contacts with Complementarity-Determining Region 3 but Excludes Superantigen-Like Recognition. *J Immunol* 1999; **163:** 2723-2731.

135. Von Bubnoff D, Matz H, Frahnert C, Rao ML, Hanau D, de la Salle H, Bieber T. FcεRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell reponses. *J Immunol* 2002; **169:** 1810-1816.

136. von Knoch M, Buchhorn G, von Knoch F, Koster G, Willert HG. Intracellular measurement of polyethylene particles. A histomorphometric study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; **121:** 399-402.

137. von Pirquet C. Allergie. *Münch Med Wschr* 1906; **53:** 1457.

138. Wang Z, Bianchi CP, Narayan SR. Nickel inhibition of calcium release from subsarcolemmal calcium stores of molluscan smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; **229:** 696-701.

139. Waterman AH, Schrik JJ. Allergy in hip arthroplasty. *Contact Dermatitis* 1985; **13:** 294-301.

140. Webster JD, Parker BS, Alfrey AC. Acute nickel intoxication by dialysis. *Ann Intern Med* 1980; **92:** 631-633.

141. Werfel T, Hentschel M, Kapp A, Renz H. Dichotomy of Blood- and Skin-Derived IL-4-Producing Allergen-Specific T Cells and Restricted Vβ Repertoire in Nickel-Mediated Contact Dermatitis. *J Immunol* 1997; **158:** 2500-2505.

142. Werfel T, Hentschel M, Renz H, Kapp A. Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **113:** 384-386.

143. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, van Horn JR. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 1997; **18:** 1115-1120.

144. Willert HG, Buchhorn GH, Fayazzi A, Lohmann C. Histopathologische Veränderungen bei Metall/Metall-Gelenken geben Hinweise auf eine zellvermittelte Überempfindlichkeit. *Osteologie* 2000; **9:** 165-179.

145. Willert HG, Semlitsch M. Tissue Reactions to Plastic and Metallic Wear Products of Joint Endoprostheses. *Clin Orthop Rel Res* 1996; **333:** 4-14.

146. Williams SP. Nickel dermatitis from coins. *Contact Dermatitis* 1999; **40:** 60-61.

147. Wüthrich B. Epidemiologie allergischer Erkrankungen. *Allergologie*. 1990: 557-566.

148. Yamage M. In vitro tests on patients with metal allergies. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1987; **189:** 890-898.

10 Lebenslauf

Name:	Summer
Vorname:	Burkhard
Geburtsdatum:	09.01.1971
Geburtsort:	München
Eltern:	Vater Dr. Rudolf Summer, Verwaltungsbeamter Mutter Waltraud Summer, geb. Scheidler, Hausfrau
Schulausbildung:	1977-1981: Grundschule Am Strehleranger, München 1981-1990: Heinrich-Heine-Gymnasium, München
Zivildienst:	1990-1991 Rettungsdienst, Rotes Kreuz
Studium:	1991-1996 TU München; Diplomstudium Biologie Hauptfach: Botanik Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Eukaryontengenetik Abschlussnote: 1,7
Berufstätigkeit:	seit 01.11.1997 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München; Allergologielabor
Persönliche Verhältnisse:	verheiratet Zur Zeit wohnhaft in 80939 München, Wohlfartstr. 2a