

**Beitrag zur Rolle von Keratinozyten für
die Aktivierung und Regulierung von immunologisch
bedingten Abwehrreaktionen der Haut**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation:
03.05.2002

vorgelegt von
Diplom-Biologe Joachim Temme Hoppmann
aus Leer

Gutachter: Prof. Dr. Tina Trenczeck

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

1	EINLEITUNG	1
2	STAND DER FORSCHUNG	2
2.1	Zytokine - Botenstoffe immunologischer Reaktionen	2
2.2	Das Immunsystem bei Säugetieren	3
2.3	Allergien	8
2.4	Immunglobuline	12
2.5	Passive Sensibilisierung	13
2.6	Zielsetzung der Arbeit	13
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Reagenzien und Geräte	15
3.1.1	Zellkulturmedien	15
3.1.2	Chemikalien	16
3.1.3	Antikörper	17
3.1.4	Geräte	17
3.1.5	Kunststoffmaterial	17
3.1.6	Pufferlösungen	18
3.1.6.1	PBS-Puffer	18
3.1.6.2	TBE-Puffer	18
3.1.6.3	MIF-Puffer	18
3.1.6.4	Trypanblau-Lösung	18
3.2	Kultur von Zelllinien	19
3.2.1	Kultivierung von murine Keratinozyten, MSC-P5	19
3.2.2	Kultivierung von b.End3-Zellen, murine Endothelzellen	20
3.2.3	Nachweis von Mykoplasmenfreiheit in Zellkulturüberständen	21
3.2.4	Bestimmung der Zellvitalität	23
3.2.5	Kalibrierung der Formazanbildung mit der Zellzahl	24
3.2.6	Bestimmung der Wachstumskurve der MSC-P5-Zellen und bend.3-Zellen	25
3.3	Nachweismethoden für Zytokine, Rezeptoren und Membranproteine	28
3.3.1	Stickstoffmonoxid-Bestimmung	28
3.3.1.1	Kalibrierung des Griess-Tests	29
3.3.2	Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch MSC-P5-Zellen	29
3.3.2.1	Behandlung von MSC-P5-Zellen mit LPS (Lipopolysacchariden)	30
3.3.2.2	NO-Freisetzung aus Keratinozyten nach Behandlung mit Natriumnitroprussid	31
3.3.3	RT-PCR	32
3.3.3.1	Isolierung der RNA	32
3.3.3.2	Isolierung von intrazellulären Proteinen	33
3.3.3.3	Durchführung der RT-PCR	34
3.3.3.3.1	mRNA-Nachweis von TNF α , Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, GADPH	35
3.3.4	Bestimmung der Zellproliferation	36
3.3.5	Proteinbestimmung	38
3.3.6	Zytokin-ELISA	39
3.3.7	Bestimmung der TNF α -Konzentrationen	39
3.4	Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen mit Toluylen-2,4-diisocyanat (Mouse Ear Swelling Test)	40
3.5	Zellkulturversuche zur passiven Sensibilisierung	42
3.5.1	Nachweis der Immunglobulin-bindenden Rezeptoren auf MSC-P5-Zellen	42

3.5.1.1	Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten mittels Fluoroskan II	42
3.5.1.2	Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten mit Durchflußzytometrie	43
3.5.1.2.1	Einfluß von Trypsin/EDTA und Accutase auf den durchflußzytometrischen Nachweis von FcεRII	45
3.5.1.3	Indirekter Nachweis der IgE-Bindung von Keratinozyten über IgE-bindende Proteine (Galektin-3)	46
3.5.1.4	Nachweis der IgG-Bindung von Keratinozyten mit dem Fluoroskan II	
3.5.2	Passive Sensibilisierung muriner Keratinozyten	
3.5.3	Bestimmung der Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entnahme des Plasmas sensibilisierter Tiere auf die Freisetzung von TNFα und IL-1β	48
3.5.4	Bestimmung von TNFα, IL-1β und IL-10 an verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung der Keratinozyten mit TDI	49
3.5.5	Passive Sensibilisierung mit reinem IgE	49
3.5.5.1	Ermittlung der geeigneten IgE-Verdünnung als Nachweis für die Freisetzung von TNFα als Reaktion der MSC-P5-Zellen auf die passive Sensibilisierung	49
3.5.5.2	Ermittlung der geeigneten DNP-BSA-Verdünnung als Nachweis für die Freisetzung von TNFα als Reaktion der MSC-P5-Zellen auf die passive Sensibilisierung.	49
3.5.6	Nachweis der Interaktion von Keratinozyten und Endothelzellen	50
3.5.6.1	Nachweis von Adhäsionsmolekülen auf der Membran von bend.3-Zellen	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Nachweis immunglobulinbindender Rezeptoren auf MSC-P5-Zellen	53
4.1.1	Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten	53
4.1.1.1	Nachweis von FcεRII mRNA	53
4.1.1.2	Immunologischer Nachweis von FcεRII	54
4.1.1.3	Durchflußzytometrischer Nachweis von FcεRII auf Keratinozyten	55
4.1.2	Fähigkeit der MSC-P5-Zellen zur Bindung von IgG	56
4.1.2.1	Bestimmung der Expression von FcγR1 bestimmt.	56
4.1.2.2	Nachweis niedrig affiner Fcγ-Rezeptoren von Keratinozyten	57
4.1.2.3	Expression des Fcγ-R1 nach Stimulation mit IL-4	58
4.1.3	Indirekter Nachweis der Bindung von IgE an Keratinozyten über Galektin-3	59
4.2	Passive Sensibilisierung von MSC-P5-Zellen mit Mäuseplasma	60
4.2.1	Wirkung von TDI auf die Vitalität der MSC-P5-Zellen	60
4.2.2	Bestimmung geeigneter Parameter zum Nachweis der Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung	61
4.2.2.1	Nachweis von Stickstoffmonoxid (ohne vorherige Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	62
4.2.2.2	Nachweis von Stickstoffmonoxid (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	63
4.2.2.3	Nachweis von TNFα (ohne vorherige Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	64
4.2.2.4	Nachweis von TNFα (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	65
4.2.2.5	Nachweis von TNFα-mRNA	66
4.2.2.6	Intrazelluläre TNFα-Konzentration	67
4.2.2.7	Nachweis von IL-1β (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	69
4.2.2.8	Nachweis von IL-10 (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)	70
4.2.3	Abhängigkeit der Reaktion vom Zeitpunkt der Plasmagewinnung nach TDI-Behandlung der Mäuse	71
4.2.3.1	Einfluß der passiven Sensibilisierung auf die Vitalität der MSC-P5-Zellen	71

4.2.3.2	Effekt der Zeitspanne zwischen Plasmagewinnung und TDI-Behandlung der Mäuse auf die Freisetzung von TNF α	73
4.2.3.3	Effekt der Zeitspanne zwischen Plasmagewinnung und TDI-Behandlung der Mäuse auf die Freisetzung von IL-1 β	74
4.2.4	Zeitverlauf der Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung	76
4.2.4.1	Zeitverlauf der TNF α -Freisetzung aus Keratinozyten	76
4.2.4.2	Zeitverlauf der IL-1 β -Freisetzung aus Keratinozyten	78
4.2.4.3	Zeitverlauf der IL-10-Freisetzung aus Keratinozyten	80
4.3	Interaktion zwischen Keratinozyten und Endothelzellen	
4.3.1	Einfluß von Keratinozyten auf die Proliferation von Endothelzellen	
4.3.2	Induktion der Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen	82
4.4	Sensibilisierung von Keratinozyten mit isoliertem IgE	84
4.4.1	Bestimmung der geeigneten IgE-Verdünnung	84
4.4.2	Bestimmung der freigesetzten TNF α -Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten DNP-BSA-Konzentration	86
5	DISKUSSION	88
5.1	Nachweis immunglobulinbindender Rezeptoren	89
5.2	Einfluß von IL-4 auf die passive Sensibilisierung	97
5.3	Freisetzung von NO als Reaktion auf die passive Sensibilisierung	99
5.4	Freisetzung von TNFα als Reaktion auf die passive Sensibilisierung	100
5.5	Freisetzung von IL-1β als Reaktion auf die passive Sensibilisierung	102
5.6	Freisetzung von IL-10 als Reaktion auf die passive Sensibilisierung	104
5.7	Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung der Mäuse und Plasmagewinnung auf die passive Sensibilisierung	105
5.8	Passive Sensibilisierung mit reinem IgE	108
5.9	Wechselwirkung zwischen Keratinozyten und Endothelzellen	108
5.10	Ausblick	111
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
7	SUMMARY	114
8	LITERATURVERZEICHNIS	1
9	ANHANG	

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

εBP	IgE-bindendes Protein
AP-1	„Activator protein 1“
APC	„Antigen presenting cell“
ATF	„Activation transcription factor“
BSA	bovines Serumalbumin
CD23	niedrig affiner Rezeptor für IgE (FcεRII)
CLA	„cutaneous lymphocyte associated antigen“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNCB	Dinitrochlorobenzen
DNP	Dinitrophenol
DTH	„Delayed type of hypersensitivity“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcγR	Rezeptoren für IgG
FcεRI	hoch affiner Rezeptor für IgE
FcεRII	niedrig affiner Rezeptor für IgE (CD23)
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GM-CSF	„Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule“
ICE	„Interleukin-1β converting enzyme“
IFNγ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL-x	Interleukin-x
IP-10	„IFNγ induced protein 10“
I-Tac	„Inducible T-cell-α chemoattractant“
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-2	Makrophagen-Glukoprotein-Marker
MAP	„Mitogen activated protein“
MEST	„Mouse ear swelling test“
MHC	„Major histocompatibility complexes“
Mig	„Monokine induced by IFNγ“
MW	Mittelwert
NFκB	„Nuclear factor κ B“
NO	Sickstoffmonoxid
PBS	„Phosphate buffered saline“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STD	Standardabweichung
TBT	Tributylin
TDI	Toluen-2,4-diisozyanat
T _H -Zellen	T-Helferzellen
T _K -Zellen	Killerzellen
TMA	Trimellitsdureanhydrid
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	„Vascular cell adhesion molecule-1“

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1: Nachweis der Mykoplasmenfreiheit vom 4.10.2000	22
Abb. 2: Nachweis der Mykoplasmenfreiheit vom 26.04.2001	23
Abb. 3: Messung der Vitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl	24
Abb. 4: Zellzahl (MSC-P5-Zellen) in Abhängigkeit der Zeit nach der Aussaat	26
Abb. 5: Zellzahl (bend.3-Zellen) in Abhängigkeit der Zeit nach der Aussaat	27
Abb. 6: Kalibrierung des Griess-Tests mit NaNO ₂	29
Abb. 7: LPS-induzierte NO-Bildung bei Keratinozyten (MSC-P5)	30
Abb. 8: Natriumnitroprussid-induzierte NO-Freisetzung	31
Abb. 9: Foto einer Gelabschätzung	34
Abb. 10: Kalibrierung der Proteinmessung	38
Abb. 11: MEST-Test zur Detektion sensibilisierter Mäuse	41
Abb. 12: Durchflußzytometrischer FcεRII-Nachweis Trypsin-behandelter Milzzellen	45
Abb. 13: Durchflußzytometrischer FcεRII-Nachweis Accutase-behandelter Milzzellen	45
Abb. 14: mRNA von FcεRII nachgewiesen mit RT-PCR	53
Abb. 15: Nachweis von FcεRII mittels FITC-markierter Antikörper im Fluoroskan II	54
Abb. 16: Durchflußzytometrischer Nachweis von FcεRII	55
Abb. 17: Prozentuale Bindung von IgG1 bzw. Antigen-IgG1-Komplex an MSC-P5	56
Abb. 18: Bestimmung des gebundenen IgG aus Mäuseplasma	57
Abb. 19: Einfluß von IL-4 auf die Bindung von IgG1 an Keratinozyten	58
Abb. 20: Freisetzung von TNFα nach passiver Sensibilisierung und Behandlung mit Laktose	59
Abb. 21: Vitalität von Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Mengen von TDI über 48 Stunden	60
Abb. 22: NO-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	62
Abb. 23: NO-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	63
Abb. 24: TNFα-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	64
Abb. 25: TNFα-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	65
Abb. 26: mRNA von TNFα und GAPDH nachgewiesen mit RT-PCR	66
Abb. 27: Intrazelluläre TNFα-Konzentration in Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung	67
Abb. 28: IL-1β-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	69
Abb. 29: IL-10-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung	70
Abb. 30: Bestimmung der prozentualen Vitalität nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma	71
Abb. 31: Bestimmung der TNFα-Freisetzung nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma	73
Abb. 32: Bestimmung der IL-1β-Freisetzung nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma	74
Abb. 33: TNFα-Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung	76
Abb. 34: IL-1β-Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung	78
Abb. 35: IL-10-Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung	80

Abb. 36: Proliferation von bend.3-Zellen nach der Behandlung mit Zellkulturüberstand von sensibilisierten Keratinozyten	81
Abb. 37: Nachweis von VCAM-1 auf Endothelzellen mittels FITC-markierter Antikörper im FluoroskanII	82
Abb. 38: Freisetzung von TNF α aus Keratinozyten 48 Stunden nach DNP-BSA Inkubation	84
Abb. 39: TNF α -Konzentration in Überständen von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die mit unterschiedlichen DNP-BSA-Konzentrationen inkubiert wurden	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Auflistung der angewandten Nachweismethoden	28
Tab. 2: Liste der Zellkulturversuche	I
Tab. 3: Nachweis CD23 auf Keratinozyten mit FluoroskanII	I
Tab. 4: Vitalität von Keratinozyten nach Behandlung mit TDI über 48 Stunden	I
Tab. 5: TNF α -Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung ohne Vorinkubation mit IL-4	I
Tab. 6: TNF α -Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorinkubation mit IL-4	I
Tab. 7: Freigesetzte NO-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung ohne Vorbehandlung mit IL-4	I
Tab. 8: Freigesetzte NO-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4	II
Tab. 9: Freigesetzte IL-1 β -Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4	II
Tab. 10: Freigesetzte IL-10-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4	II
Tab. 11: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die Vitalität von Keratinozyten während der passiven Sensibilisierung	II
Tab. 12: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die TNF α -Freisetzung	II
Tab. 13: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die IL-1 β -Freisetzung	III
Tab. 14: Zeitkurve TNF α -Freisetzung	III
Tab. 15: Zeitkurve IL-1 β -Freisetzung	III
Tab. 16: Zeitkurve IL-10-Freisetzung	IV
Tab. 17: Proliferation bend.3-Zellen	IV
Tab. 18: Expression VCAM-1	IV
Tab. 19: Passive Sensibilisierung mit reinem IgE – Einfluß unterschiedlicher IgE-Verdünnungen	IV
Tab. 20: Freisetzung von TNF α aus Keratinozyten 48 h nach DNP-BSA-Inkubation	V

1 EINLEITUNG

Um die Rolle von Keratinozyten in immunologisch bedingten Abwehrreaktionen der Haut untersuchen zu können, wurde das *In-vitro* Testsystem „Passive Sensibilisierung muriner Keratinozyten“ während der Dissertation etabliert. Epidermale Keratinozyten gehören zum ersten Zelltyp, der Kontakt mit einem über die Haut aufgenommenen Antigen erhält. Wie als Folge der Antigenbindung Keratinozyten die immunologische Abwehrreaktion beeinflussen können, soll mit dem Testsystem untersucht werden. Die passive Sensibilisierung von Zellen wurde in Anlehnung an RABE et al. (1998) durch Inkubation mit Blutplasma oder mit Antigen-Immunglobulinkomplexen erreicht. In ihren Versuchen wurden broncheale Muskelzellen von Asthmatikern sensibilisiert. Versuche an humanen Keratinozyten wurden von BÈCHEREL et al. (1994) durchgeführt. Hier wurden Keratinozyten mit reinen IgE-Antigenkomplexen inkubiert. Jedoch entspricht dieser Versuchsaufbau nicht den *In-vivo* Bedingungen. Daher sollten in eigenen Versuchen Keratinozyten durch die Inkubation mit Plasma, das von allergischen Mäusen gewonnenen wurde, sensibilisiert werden. DEARMAN und KIMBER (1991) fanden in Plasma von Mäusen, die unter vergleichbaren Bedingungen sensibilisiert wurden, neben antigenspezifischem IgE auch verschiedenen IgG-Subtypen. Dass das Vorhandensein verschiedener Immunglobulinsubtypen für die Sensibilisierung eine wichtige Rolle spielt, wurde in eigenen Versuchen deutlich, in denen Plasma zur Sensibilisierung eingesetzt wurde, das zu verschiedenen Zeitpunkten nach Antigenbehandlung von Mäusen gewonnen wurde. An die passive Sensibilisierung der Keratinozyten schloß sich die Inkubation mit dem spezifischen Antigen an. Das Antigen wurde über membranständige Immunglobuline an die Keratinozyten gebunden. Im Vordergrund der Arbeit steht die Fragestellung, welche Mediatoren die Keratinozyten als Folge der Antigenbindung freisetzen. Durch die Freisetzung von Mediatoren ist es Keratinozyten möglich, mit anderen Zellen des Immunsystems zu kommunizieren. Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden, gehören zu wichtigen Zellen des Immunsystems. Sie sind für die Umverteilung von zirkulierenden Entzündungszellen aus dem Blut ins Gewebe verantwortlich. Zur Bindung von Entzündungszellen aus dem Blut sind Adhäsionsmoleküle auf der Membran von Endothelzellen erforderlich. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Mediatoren wie z.B. TNF α die Expression dieser Adhäsionsmoleküle induzieren. Wenn Mediatoren, die von passiv sensibilisierten Keratinozyten freigesetzt werden, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren, ist dies ein Hinweis auf die Be-

teilung von Keratinozyten während immunologisch bedingter Abwehrreaktionen der Haut. Daher wurden Endothelzellen mit dem Zellkulturüberstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten inkubiert und deren Proliferationsrate sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen bestimmt.

2 STAND DER FORSCHUNG

2.1 Zytokine - Botenstoffe immunologischer Reaktionen

Schon lange ist bekannt, dass epitheliale Zellen, zu denen auch Keratinozyten gehören, eine physiologische Schutzbarriere zur Umwelt darstellen. Dass Keratinozyten auch eine wichtige Rolle bei der kutanen immunologischen Abwehrreaktion besitzen, wurde 1990 erstmals festgestellt (MC KENZIE und SAUNDER, 1990). Die Beobachtung, dass Keratinozyten Botenstoffe produzieren und freisetzen, die bei Entzündungsvorgängen und bei der Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen, hat zu einem wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet der kutanen Immunbiologie geführt (ENK und KATZ, 1992). Zytokine, die ihre Wirkung bereits im Subnanogrammbereich entfalten, sind für eine große Zahl biologischer Aktivitäten verantwortlich (WILMER et al., 1994).

Zytokine sind definitionsgemäß wasserlösliche, induzierbare, heterogene Proteinmediatoren mit einem Proteingewicht von mehr als 5000 kDa. Die meisten dieser Mediatoren diffundieren nach ihrer Sekretion in die nähere Umgebung und beeinflussen auch die Funktion der sezernierenden Zelle (HSU und HSU, 1994).

Die Synthese von Zytokinen wird meist durch Gentranskription eingeleitet. Die Kombination einer kurzen Transkriptionsphase und der Kurzlebigkeit der mRNA-Moleküle sind der Grund für eine transiente Zytokinbildung. Einige Zytokine werden durch posttranskriptionale Mechanismen aktiviert. Ein Beispiel für solche Mechanismen ist die proteolytische Abspaltung einer Hemmgruppe vom Precursor-Molekül. Kurz nach ihrer Produktion werden die Zytokine aus den Zellen exportiert (VAN WAUWE et al., 1996). Die gleichen Zytokine können von unterschiedlichen Zellen gebildet werden. Ihre Wirkung ist nicht auf eine bestimmte Zellart limitiert (Pleiotropismus). Zu den Zytokinen gehört die Gruppe der Interleukine, deren Name basierend auf der falschen Annahme gewählt wurde, dass Zytokine

nur von Leukozyten gebildet werden und nur Wirkung auf Leukozyten ausüben (ABBAS et al., 1997). Sie besitzen eine weitere Eigenschaft, nämlich die der Redundanz, was bedeutet, dass unterschiedliche Typen die gleiche Reaktion an den Zielzellen auslösen können. Dabei wird die Wirkung oft von der Anwesenheit anderer Zytokine beeinflusst. Es kann sowohl zu antagonistischen als auch zu synergistischen Effekten kommen. Die Zytokine binden bereits in niedriger Konzentration mit hoher Affinität an Rezeptoren (K_d 10^{-10} bis 10^{-12}) (BENVENISTE et al., 1989). Diese Rezeptormoleküle sind integrale Glykoproteine, die aus drei Domänen bestehen: dem extrazellulären Rezeptor als Bindungsstelle für das Zytokin, einem hydrophoben Membranteil und einem Abschnitt auf der Innenseite der Plasmamembran, der die Signaltransduktion vermittelt. An der Transduktion sind Calmodulin, Guanosinphosphat-bindende Proteine (G-Proteine), Adenylatcyclase und Proteinkinase A beteiligt. Andere Rezeptoren beinhalten selbst eine Tyrosinkinase, die nach Stimulation Phospholipasen aktiviert (HERZ et al., 1997). Dies führt zum Abbau von Inositolphospholipiden der Plasmamembran. Das entstehende Inositoltriphosphat setzt intrazellulär Ca^{2+} frei und Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C (STRYER, 1979). Zytokine sind wichtige Mediatoren, die für Zell-Zell-Interaktionen während immunologischer Reaktionen verantwortlich sind.

2.2 Das Immunsystem bei Säugetieren

Den Vertebraten dient das Immunsystem zur Abwehr pathogener Keime. Dabei werden körperfremde Strukturen (z.B. Mikroorganismen) erkannt und eliminiert (WEHNER und GEHRING, 1990). Kommt es zu fehlregulierten Reaktionen, treten Allergien, chronische Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen auf (ABBAS et al., 1997). Außerdem ist es möglich, dass sich die Abwehrmechanismen auch gegen körpereigene Strukturen richten. Daher ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems die Trennung zwischen körperfremd und körpereigen. Dies wird durch den Mechanismus der Immuntoleranz gewährleistet. Bei der Abwehr von pathogenen Keimen tritt zunächst die unspezifische Abwehr (natürliche Resistenzmechanismen) in Kraft. Zu diesen Mechanismen wird die Barrierefunktion der humanen Haut und Schleimhäute (niedriger pH-Wert, Sekretion bakterizider Substanzen wie Lysozym oder Laktoferrin) gerechnet (WEHNER und GEHRING, 1990). Überwinden Keime diese Abwehrmechanismen und gelangen in das Körperinnere, werden unspezifische zelluläre und humorale Abwehrmechanismen aktiviert. Das Immunsystem

besteht aus lymphoiden und myeloiden Zellen (basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) sowie spezialisierten epithelialen Zellen. Bei den lymphoiden Zellen werden T- und B-Lymphozyten unterschieden, die von Stammzellen gebildet werden (ABBAS et al., 1997). Die Ausdifferenzierung der B-Zellen setzt schon im Knochenmark ein. Die von diesen Zellen gebildeten Antikörper binden an Fremdproteine und markieren diese für bestimmte Abwehrzellen als zu eliminierende Objekte (humorale Immunität). Aus der anderen Hauptlinie gehen die T-Lymphozyten hervor, die im Thymus heranreifen. Sie bekämpfen Erreger, die in Zellen eingedrungen sind. Dazu schütten sie Lymphokine aus und aktivieren und steuern B-Zellen, andere T-Zellen und weitere Komponenten des Immunsystems (SHORTMAN und WU, 1996). Beide Sorten von Zellen wandern nach der Ausdifferenzierung in die Milz, in die Lymphknoten und das Lymphgewebe des Darms. Stoßen sie dort auf Antigene, dann treten sie in Aktion. Ansonsten zirkulieren sie durch die Blutgefäße und das Lymphsystem (CONSTANT et al., 1995).

Das Signal, dass eine Stammzelle zu einer B-Zelle ausreift, wird von den umliegenden Zelle gegeben. So agieren Bindegewebszellen mit den ersten Vorläuferstadien der B-Zellen über Oberflächenmoleküle. Sie produzieren außerdem Proteinfaktoren (z.B. Interleukin-7), die an Rezeptoren von Pro- und Prä-B-Zellen binden und diese veranlassen, sich weiter zu teilen und weiter auszudifferenzieren (SUGIHARA et al., 2000). Im Prä-B-Stadium werden die Gene für die schweren Ketten zusammengesetzt und abgelesen. Zugleich entstehen zwei weitere Genprodukte, die in die Zellmembran eingebaut werden: die Immunglobuline Alpha und Beta (IgA und IgB). Mit diesen beiden Proteinen vereinen sich die leichten und die schweren Ketten zu einer Antigen-Rezeptor-Einheit, die zur Zelloberfläche wandert. Wird das spezifische Antigen erkannt, wird diese Information zum Zellkern weitergeleitet. Ab diesem Stadium wird die Zelle B-Zelle genannt, die mit dem Blut durch den Körper zirkuliert (ABBAS et al., 1997).

Die Entwicklung der T-Zellen ist komplexer, da sie im Thymus zu mehreren Typen wie Helfer- oder Killerzellen differenzieren können. In dem Entwicklungsprozeß dieser Zellen werden zunächst diejenigen Zellen eliminiert, die nicht in der Lage sind, körpereigene MHC-Komplexe zu erkennen. Zellen, die zu heftig mit körpereigenen Zellen reagieren, werden im nächsten Ausleseschritt ausgesondert (BABBITT et al., 1985). Die Zellen, die nach dieser Auswahl überleben, verlassen den Thymus und verteilen sich im Körper. Wäh-

rend die Zellen sich im Thymus teilen und ihre Oberflächenproteine verändern, stellen sie auch die Abschnitte der Gene, die den Hauptrezeptor codieren, um. So werden bei der Maus die Ketten für T-Zell-Rezeptoren gleichzeitig mit oder bereits vor der Expression der beiden Hilfsrezeptoren zusammengebaut und auf der Oberfläche ausgeprägt. Diese Vorläuferzellen sind in der Lage, mit MHC-präsentierenden Zellen im Thymus zu interagieren. Von den Zellen, die sich an MHC-Proteine der Klasse 1 anlagern, werden die meisten später zu Killerzellen. Solche, die mit der Klasse 2 reagieren, entwickeln sich überwiegend zu Helferzellen. Die restlichen Zellen, die keinen MHC-Komplex herstellen, sterben ab (SEBZDA et al., 1999). Nachdem T-Zellen in ihrer Entwicklung festgelegt sind, hört die Produktion des jeweils nicht mehr benötigten Hilfsrezeptors auf und die des T-Zell-Rezeptors steigt. Zusätzlich erhalten sie Homing-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden nach dem Verlassen des Thymus benötigt, um an der richtigen Stelle aus der Blutbahn in die für sie bestimmten peripheren Lymphorgane zu gelangen (HAWKINS et al., 2000).

Der erste Kontakt der Haut mit dem Antigen führt zur Bildung von antigenspezifischen T-Zellen in den Lymphknoten und deren Einwanderung in die Haut. Nach der Bindung des Antigens an die Langerhans-Zellen beginnen diese, aus der Haut in die Lymphknoten einzuwandern. Epidermale Zytokine wie TNF α und IL-1 β stellen Reize zur Einleitung der Migration der Langerhans-Zellen dar. Die Wanderung geht einher mit der Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zellmembranoberfläche der Langerhans-Zellen: E-Cadherin (SCHWARZENBERGER et al., 1996), β 1-Integrin (AIBA et al., 1993), CD44-Isoformen (WEISS et al., 1997) und Chemokine (PROUDFOOT, 1998). In den Lymphknoten werden die gebundenen Antigene den naiven T-Lymphozyten präsentiert. Zellen erkennen Antigene durch die Bindung an die T-Zell-Rezeptoren, die von CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Zellen exprimiert werden. Dabei reagieren T-Zellen hauptsächlich mit den an MHC-Klasse 2-Komplexe gebundenen Antigenpeptiden und zweitrangig mit Domänen des MHC-Moleküls (WELTZIEN et al., 1996). CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -T-Zellen sind in der Lage, entzündliche Hautreaktionen einzuleiten. Je nach den spezifischen Eigenschaften des Antigens werden entweder CD4 $^{+}$ - oder die CD8 $^{+}$ -T-Zellen aktiviert. Dabei werden die CD8 $^{+}$ -T-Zellen durch Antigene aktiviert, die vom MHC-Klasse 1-Komplex dargeboten werden, während eine Antigenpräsentation durch den MHC-Klasse 2-Komplex zu einer Stimulation der CD4 $^{+}$ -Zellen führt (BOUR et al., 1995). Es besteht eine funktionale Dichotomie zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Präsentation von Antigenpeptiden durch dendritische Zellen. CD8 $^{+}$ -T-Zellen leiten Re-

aktionen infolge einer Kontaktsensibilisierung ein, indem sie Typ I-Zytokine sezernieren. Zu der Gruppe der Typ I-Zytokine gehört unter anderem Interferon- γ (IFN γ). Interleukin 12, das von dendritischen Zellen gebildet wird, ist der Hauptfaktor, der zur Bildung des Typ I-Phänotyps aus naiven T-Zellen führt (DEARMAN et al., 1996). Die Aktivierung der antigenspezifischen T-Lymphozyten führt zur Auswanderung aus den Lymphknoten über das Lymphgefäßsystem und das Blutgefäßsystem in den gesamten Organismus. Antigen-spezifische T-Lymphozyten, die von Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen aktiviert wurden, exprimieren an ihrer Oberfläche ein cutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen (CLA) und sind in der Lage, aus post-kapillaren Venen in die Dermis einzuwandern (PICKER et al., 1993). Die weitere Entwicklung der beiden Zelltypen wird durch die Bindung von körperfremden Substanzen an die Zellrezeptoren eingeleitet. Solange die reifen Zellen noch nicht immunologisch aktiv sind, halten sich beide Zellsorten innerhalb der Lymphorgane in getrennten Bereichen auf. Erst nach der Antigen-Stimulation reagieren die künftig Beteiligten bei der Antikörperproduktion in vielfältiger Weise miteinander, wobei sie an den Grenzen der T- und B-Zell-domänen neue Zellaggregate bilden. Dort treffen nun drei Zelltypen aufeinander: aktivierte T-Helferzellen (T_H-Zellen), B-Zellen und spezielle dendritische Zellen. B-Zellen, die in Kontakt mit dem Antigen getreten sind, vermehren sich zu Klonen (NAKAMACHI et al., 1994) und differenzieren zu reifen B-Zellen aus. Während dieser Reifungsprozesse unterliegen B-Zellen genetischen Veränderungen, die einen Beitrag zur Antikörperdiversität leisten. Sie modifizieren die Genteile, die für ihren spezifischen Antikörper kodieren, so dass der neue dem alten zwar ähnelt, aber vielleicht noch eine größere Bindungsaffinität zum Antigen aufweist als der Originalrezeptor (APEL und BEREK, 1990). Einige B-Zellen werden nach Interaktion mit T_H-Zellen zu Plasmazellen, die nun Antikörper ausschütten. Es entstehen mehrere Arten von Plasmazellen, deren freigesetzte Antikörper zwar auf das gleiche Antigen reagieren, aber für unterschiedliche Aspekte der Immunantwort zuständig sind. Andere B-Zellen werden zu Gedächtnis-Zellen, die eine Art molekularer Erinnerung an den Erreger bewahren und bei einer neuerlichen Konfrontation beschleunigt reagieren (ABBAS et al., 1997). Die Immunantwort wird innerhalb der Lymphorgane organisiert, doch die Lymphozyten pendeln zwischen Blutstrom und lymphatischen Organen. So ist im Fall eines Eindringens von körperfremden Substanzen gewährleistet, dass schnell eine Auswahl aller Lymphozyten mit einem passenden Rezeptor vorhanden ist. Die Lymphozyten gelangen über die Blutbahn in die Lymphorgane. Die speziellen Blutgefäße (Hochendothel-Venolen) sind mit besonders

dicken, für andere Zellen undurchdringbaren, Innenwänden ausgekleidet. An diesen Wänden befinden sich spezielle Erkennungsstrukturen für die erwähnten Homing-Rezeptoren der Lymphozyten (HARRIS und MIYASAKA, 1995). Sind die B- und die T-Zellen aktiviert, wird schnell die Produktion ihrer üblichen Homing-Rezeptoren eingestellt. Stattdessen exprimieren sie nun ein Verankerungsmolekül (Integrin), das sich an ein bestimmtes Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1, **V**ascular **c**ell-**a**dhesion **m**olecule) auf den Gefäßwänden zu heften vermag. Diese aktivierten Immunzellen können, wenn sie in den Blutstrom entlassen werden, nicht mehr in normale, gesunde lymphatische Gewebe zurückkehren. Stattdessen binden sie an das Endothel der Blutgefäße, die infizierte, entzündete und antigenreiche Gewebe versorgen. Vermutlich prägen nur diese Gewebe VCAM-1 aus (POSTIGO et al., 1991).

Die neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die in das Gewebe eindringen, in dem die zellvermittelte Immunreaktion abläuft, werden funktionell aktiviert, so dass sie bakteriostatische und bakterizide Wirkungen ausüben können. Ziel ist die Eliminierung der Fremdantigene und die Wiederherstellung „normaler“ Verhältnisse (MARZIOET al.,1997). Gelingt die Eliminierung des Antigens nicht, so kommt es zu einer anhaltenden Proliferation der Fibroblasten, die zur Produktion von Kollagen, zur Fibrose und zur Granulombildung angeregt werden (HAMILTON et al., 2001).

Vorläufer der zytotoxischen T-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluß von IL-2, IFN γ und IL-6 aus T_H-Zellen zu Effektorzellen. Die T_K-Zellen erkennen Zielzellen, die das endogene Molekül exprimieren. Sie werden dabei aktiviert und können die Zielzelle lysieren (LEONG et al., 1997).

Die adaptive Immunität beruht auf klonaler Selektion. Die B-Zellen stellen Antikörper her und bringen sie zur Zelloberfläche, wo sie im Sinne von Rezeptoren fungieren. Jede B-Zelle exprimiert einen individuell gestalteten Rezeptor, so dass jede eine andere Fremdstruktur erkennt. Eine Bindung des Rezeptors an eine eingedrungene Fremdstruktur löst eine gesteigerte Proliferation der B-Zelle aus. Diese geklonten B-Zellen differenzieren weiter und setzen als Plasmazelle große Mengen ihres Antikörpers frei (WILLIAMSON et al., 1974). Diese Antikörper bilden mit den Fremdkörpern einen Komplex, der Freßzellen und das Komplementsystem aktiviert. Die adaptive Immunität hat die Aufgabe bei einem wiederholten Kontakt mit der Fremdsubstanz die Immunantwort rascher einzuleiten. Der

Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass die Umwandlung von B-Zellen in antikörper-freisetzende Plasmazellen bei erstmaligem Kontakt einen Zeitraum von ca. 5 Tagen benötigt. Außerdem ist es nicht ausgeschlossen, dass die Vielzahl von Antikörpern auch körpereigene Makromoleküle erkennen und so eine Autoimmunreaktion auslösen (KELLER, 1987).

2.3 Allergien

Unter Umständen kann Antigenkontakt zu überschießenden immunologischen Reaktionen führen, die sich klinisch als Allergien darstellen können.

Die Beschreibung des Heuschnupfens als allergische Reaktion von J. BOSTOCK im Jahr 1819 bildete den Beginn der Allergieforschung. 54 Jahre später fand C. BLACKLEY heraus, dass der Kontakt mit Gräserpollen die Ursache für die Auslösung der allergischen Reaktion darstellt. PRAUSNITZ und KÜSTERS machten 1921 einen Serumfaktor für die Manifestation der Allergie verantwortlich. Die nähere Bestimmung gelang JOHNSEN und ISHIZAKAS 45 Jahre später, indem sie den Serumfaktor als Immunglobulin E identifizierten (COHEN und SAMTER, 1992). Erst in den letzten dreißig Jahren wurden große Fortschritte um das Verständnis der allergischen Reaktion erzielt. Dieser Prozeß geht einher mit einem dramatischen Anstieg der Zahl der Patienten, die an allergischen Reaktionen erkrankt sind. War eine allergische Erkrankung zur Zeit von BOSTOCK und BLACKLEY ein Problem der privilegierten Klasse, so ist in westlichen Industrienationen heutzutage nahezu die Hälfte der Bevölkerung gegen ein oder mehrere Umweltallergene sensibilisiert (PEAT und LI, 1999). In Ländern wie Großbritannien oder Australien liegt der Prozentsatz der Kinder unter 14 Jahren, die an Asthma erkrankt sind, bei 25% (BEASLEY, 1998). Eine Hypothese, die die drastische Zunahme allergischer Patienten zu erklären versucht, gibt als Grund einen verringerten Kontakt des Organismus mit Parasiten an. Der so unterforderte Teil des Immunsystems richte sich nun gegen andere Substanzen (z.B. Birkenpollen). Für diese Theorie spricht der epidemiologische Befund, wonach allergische Erkrankungen in Entwicklungsländern seltener auftreten als in Industrienationen (LICHTENSTEIN, 1996). Die allergischen Reaktionen können in vier verschiedene Typen unterschieden werden:

- **Typ I-Reaktion: Überempfindlichkeitsreaktion vom Sofort-Typ**

Beispiele für die Typ I-Reaktion sind allergisches Asthma oder Heuschnupfen. Etwa 10% der Bevölkerung neigen zu Allergien, die auf Typ I-Immunmechanismen beruhen. Die Menschen, die eine genetische Disposition für Allergien aufweisen, werden Atopiker genannt. Diese Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I stellt sich als eine sofort nach dem Allergenkontakt einsetzende allergische Reaktion dar. Atopie und Allergie treten zwar familiär gehäuft auf, jedoch unterliegt diese Ausprägung keinem einfachen Erbgang (SCHNYDER, 1960). Im "*candidate gene approach*" werden polymorphe Gene untersucht, die Bedeutung für Atopie und Allergie besitzen. Dabei stehen IgE, der hochaffine IgE-Rezeptor und die IgE-Synthese-regulierenden Zytokine im Vordergrund. Zu diesen Zytokinen zählen unter anderem die Interleukine 3, 4 und 5 und das Interferon- γ sowie Zytokinrezeptoren. Weitere Untersuchungsgebiete beziehen sich auf Elemente der Effektorphase (z.B. Mastzell-Chymase), sowie die Strukturen der Zielgewebe, an denen sich allergische Reaktionen manifestieren (MALY et al., 1998). Der entscheidende Schritt bei der Ausbildung der Typ-I-Allergie ist das Umschalten der Antikörperproduktion auf den Isotyp IgE in aktivierten B-Lymphozyten (De VRIES et al., 1993).

Erstkontakt mit dem Antigen

Bei erstmaligem Kontakt wird ein Antigen von B-Zellen über membranständiges IgM erkannt. Daraufhin differenzieren sie unter Einfluß von T-Helferzellen zu IgE-sezernierenden Plasmazellen (ZHANG und MILLS, 1994). Das IgE bindet an spezifische hochaffine Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Dadurch erhalten diese Zellen einen membrangebundenen Antigenrezeptor.

Zweitkontakt mit dem Antigen

Zellen mit membranständigem Antigenrezeptor binden bei Zweitkontakt das Antigen. Durch die Kreuzvernetzung der Rezeptoren werden die Zellen aktiviert, die daraufhin Mediatoren (z.B. Histamin, Zytokine, Lipidmediatoren) freisetzen (DURHAM und STEPHEN, 1998). Diese Mediatoren sind die Ursache für die klinische Symptomatik der allergischen Reaktion, die bereits Sekunden nach Allergenkontakt einsetzen kann. An der Haut bestehen die Symptome hauptsächlich aus Rötung, Juckreiz und Ödembildung. Zwei bis vier Stunden nach dem Kontakt setzt die Spätphasenreaktion ein, die durch eine Gewebsinfiltration mit eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist (ABBAS et al., 1997 ; DURHAM und STEPHEN, 1998).

- **Typ II-Reaktion: Antikörper-abhängige Überempfindlichkeitsreaktion vom zytotoxischen Typ**

Die Äußerungen der humoralen zytotoxischen Immunreaktion werden durch Antikörper vermittelt, deren Spezifität sich gegen ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Antigen richtet. Die Immunreaktion benötigt die Bindung von Antikörpern an fixierte Antigene. Ist das Antigen ein Autoantigen, dann richten sich die IgM- bzw. IgG-abhängigen Effektormechanismen gegen körpereigene Zielstrukturen wie z.B. eigene Erythrozyten (SUANKRATAY et al., 1999). Dabei können die Zielantigene auf Oberflächen oder im Gewebe lokalisiert sein. Der Isotyp des Antikörpers bestimmt den Schweregrad und den Charakter der pathologischen Immunreaktion. Die verschiedenen Mechanismen der Gewebsschädigung umfassen die komplementvermittelte Lyse antikörperbeladener Zielzellen, die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen unter Beteiligung chemotaktischer und zellaktivierender Spaltprodukte („Anaphylatoxine“), die Phagozytose antikörperbeladener Zellen und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (LE BOUTEILLER et al., 1976). Die Aktivierung der Leukozyten erfolgt durch die Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Entzündungszellen. Die aktivierten Entzündungszellen setzen proinflammatorische und gewebsschädigende Faktoren frei (MINGARI et al., 1995).

- **Typ III-Reaktion: Immunkomplex-vermittelte Reaktionen**

Diese Reaktionen beruhen auf frei im Blut zirkulierenden Immunkomplexen. Sie werden sekundär in den Gefäßwänden verschiedener Gewebe abgelagert und aktivieren dort Effektormechanismen. Diese Aktivierung führt zu entzündlichen Gefäßveränderungen. Die Ablagerung kann in allen Geweben auftreten, jedoch sind sie vermehrt in der Haut, in der Niere und im Synovialgewebe anzutreffen. Die Typ III-Reaktion zeigt im Gegensatz zur Typ I-Reaktion primär einen systemischen Verlauf (ABBAS et al., 1997).

Die Größe der sich bildenden Immunkomplexe wird unter anderem von dem aktuellen Verhältnis von Antigen und Antikörper bestimmt. Bei Äquivalenz entstehen große Komplexe, die von Makrophagen eliminiert werden. Sie verursachen keine Krankheitssymptome. Kleinere bis mittelgroße Komplexe werden wesentlich langsamer eliminiert. Sie bleiben länger in Zirkulation, können zwischen den Zellen des Gefäßendothels auf die Basalmembran gelangen, sich dort ablagern und eine Entzündung verursachen. Einmal abgelagerte Komplexe können durch ein Komplement wieder solubilisiert werden. Sowohl Typ I-

als auch Typ II-Mechanismen beruhen auf der Bindung des Antikörpers an das spezifische Antigen und aktivieren die gleichen Folgemechanismen (ROTHLEIN und KIM, 1983).

- **Typ IV-Reaktion: T-Zellvermittelte pathogene Reaktionen**

- „**Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ**“;

Delayed Type of Hypersensitivity, DTH

Die typische DTH-Reaktion wird hauptsächlich von T-Helferzellen getragen, jedoch sind auch zytotoxische T-Zellen daran beteiligt. Die T-Helferzellen rekrutieren und aktivieren Makrophagen. Während des Ablaufs der DTH sezernieren aktivierte T-Zellen unterschiedliche Zytokine. So stimuliert IL-2 die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellklonen und von benachbarten nicht antigenspezifischen T-Zellen. IFN γ bewirkt die funktionelle Aktivierung der APC -besonders Makrophagen- und verstärkt sowohl die Expression von MHC-Klasse 2-Molekülen als auch die Effektorphase der DTH (MATSUSHIMA und STOHLMAN, 1991). Es kommt zu einem mononukleären Infiltrat (B-Lymphozyten, Makrophagen). Auch dieser Allergietyp kann sich gegen körpereigene oder körperfremde Strukturen richten.

Eine Reihe von Erkrankungen wird durch Antigenkontakt über die Haut ausgelöst (Kontaktdermatitis). Hautreaktionen werden oft durch Fremdmaterial wie Medikamente oder Kosmetika verursacht (BARBAUD, 2000). Die Reaktion resultiert in ein mononukleäres Zellinfiltrat (Höhepunkt 12-15 Stunden nach Antigenkontakt) und führt zu einem Ödem der Epidermis mit Bläschenbildung (KRAWIEC und GAUFAR, 1975).

Bei der kutanen basophilen Überempfindlichkeit -auch Jones-Mote-Reaktion genannt- werden zwei Phasen unterschieden:

In der 1. Phase wird bei der Immunisierung über die Haut primär eine T-zellabhängige Reaktion induziert. Parallel wird die Bildung antigen-spezifischer IgE-Moleküle eingeleitet.

In der 2. Phase kommt es bei erneutem Allergenkontakt über die Haut zum Bild einer anti-körpervermittelten Reaktion vom Sofort-Typ. An der Antigen-Kontaktstelle bildet sich ein Infiltrat aus basophilen Granulozyten, die mit antigenspezifischem IgE beladen wurden. Beim Zweitkontakt mit dem Antigen werden die basophilen Granulozyten über ihr membranständiges IgE aktiviert und lösen eine Typ I-Reaktion aus (JACYSYN et al., 2001).

2.4 Immunglobuline

Immunglobuline erfüllen während Überempfindlichkeitsreaktionen die Funktion der Fremdstrukturerkennung. Alle Immunglobuline besitzen eine gemeinsame Kernstruktur, die sich aus zwei identischen leichten Ketten (~ 24 kD) und zwei identischen schweren Ketten (~55-70 kD) zusammensetzt. Je eine leichte Kette ist mit einer schweren Kette verbunden, während die beiden schweren Ketten miteinander gekoppelt sind. Beide Ketten besitzen eine Sequenz sich wiederholender Aminosäuren, die die Immunglobulin-Domäne bilden. Alle Moleküle, die solch ein Motiv besitzen, werden zur Ig-Superfamilie gerechnet (ABBAS et al., 1997).

Die Antikörperklassen werden in Isotypen untergliedert. Humane Immunglobulinklassen tragen folgende Bezeichnungen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Mäuse besitzen die gleichen Isotypen wie Menschen, jedoch wird IgG in IgG₁-, IgG_{2a}-, IgG_{2b}- und IgG₃-Subklassen unterteilt (STRYER, 1985).

Chemische Substanzen, die bei der spezifischen Antikörperbindung vom Immunsystem erkannt werden, werden als Antigene bezeichnet. Während letztlich nahezu alle Moleküle die Bildung von Antikörpern induzieren können, aktivieren nur Makromoleküle die Lymphozyten direkt. Haptene sind kleine Moleküle, die zuerst an ein Protein gebunden werden müssen, um eine immunologische Antwort zu induzieren (SEMAN et al., 1982). Normalerweise sind Makromoleküle sehr viel größer als die Antigen-Bindungsstelle der Antikörper. Deshalb bindet der Antikörper nur an eine spezifische Stelle (Epitop oder Determinante) des Antigens. Ein Antigen kann somit als eine exogene Determinante angesehen werden, die an ein Makromolekül bindet (KELLER, 1987).

2.5 Passive Sensibilisierung

1921 wurde in einem Versuch von PRAUSNITZ und KÜSTNER die Bedeutung von Blutserum auf die Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber einem Antigen gezeigt. Die Injektion des Serums von H. KÜSTNER, der auf Fisch allergisch reagierte, löste bei C. PRAUSNITZ eine allergische Reaktion aus, wenn Fischantigen in die sensibilisierte Gegend injiziert wurde (PRAUSNITZ und KÜSTNER, 1921). Dies war der erste Hinweis, dass eine Substanz innerhalb des Blutserums für den Transfer der Überempfindlichkeit verantwortlich ist. Die passive Sensibilisierung, hervorgerufen durch die Übertragung von Blutserum von Allergikern, wurde 1967 auf ein *In-vitro*-Modell übertragen (LEVY et al., 1967). In diesen Versuchen wurden naive Zellen durch die Inkubation mit Serum von Allergikern passiv sensibilisiert. LEWY (1967) verwendete bronchiale, glatte Muskelzellen, die als Reaktion auf die passive Sensibilisierung und anschließende Behandlung mit dem spezifischen Antigen Histamin freisetzen. Darüber hinaus kam es als Folge der passiven Sensibilisierung zur Kontraktion der glatten Muskelzellen. Anstelle des Blutserums wurden von anderen Arbeitsgruppen auch reine Antigen-Immunglobulin-Komplexe für die passive Sensibilisierung verwendet. Makrophagen reagierten auf die Behandlung mit DNP/IgE-Komplexen mit der Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (BAYON et al., 1998).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Aspekte der Beteiligung epidermaler Keratinozyten an der immunologischen Reaktion untersucht werden. Obwohl die Haut relativ einfach aufgebaut ist, ist sie ein hochkomplexes, heterogenes Organ, welches neben Keratinozyten und Melanozyten weitere Zellpopulationen enthält, die aus dem Knochenmark stammen. Diese Zellen sind unter anderem an der Induktion der kutanen Immunantwort beteiligt, die vorwiegend nach NOSSAL (1987) von drei wesentlichen Faktoren abhängt:

- Vorhandensein von akzessorischen Zellen, deren Aufgabe es ist, Antigene aufzunehmen, zu verarbeiten und Proteinfragmente dem Lymphozytensystem zu präsentieren. Sie sind als antigenpräsentierende Zellen (APC) bekannt (STEINMANN et al., 1995).
- T-Zellen, die in der Lage sind, auf präsentierte Antigen signale mit gesteigerter Proliferation zu reagieren (WELTZIEN et al., 1996).

- Zytokine, die Signale für die Proliferationssteigerung von T-Zellen darstellen oder die Freisetzung dieser Botenstoffe bewirken können (DONG et al., 1999).

Seit 1990 war bekannt, dass Keratinozyten als Reaktion auf die Behandlung mit sensibilisierenden Substanzen eine Vielzahl von Zytokinen freisetzen können (MC. KENZIE et al. 1990). Vor allem Antigene (Kontaktallergene), die über die Haut aufgenommen werden, rufen Reaktionen in Keratinozyten hervor. Dabei treten die epithelialen Keratinozyten als erster Zelltyp in Kontakt mit dem Antigen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von vorher sensibilisierten Keratinozyten untersucht werden. In Arbeiten von BÈCHEREL et al. (1994) reagierten Keratinozyten auf Inkubation mit IgE/Anti-IgE-Komplexen mit der Freisetzung von NO und TNF α . Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen sollte in eigenen Versuchen anstelle des reinen IgE ein Gemisch aus Immunglobulinen zur passiven Sensibilisierung von Keratinozyten verwendet werden, um eine Situation zu simulieren, die an *In-vivo*-Bedingungen angepaßt ist. Das verwendete Plasma stammte aus Mäusen, die gegen TDI sensibilisiert wurden. DEARMAN und KIMBER (1991) fanden in Plasma, das unter vergleichbaren Bedingungen gewonnen wurde, die Antikörper: IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Es sollte untersucht werden, welche Mediatoren als Reaktion der passiven Sensibilisierung mit Mäuseplasma von Keratinozyten freigesetzt werden.

Eine weitere Fragestellung beschäftigte sich mit dem möglichen Einfluß von aus Keratinozyten freigesetzten Mediatoren auf Endothelzellen während immunologischer Reaktionen. Dazu wurden Endothelzellen mit dem Überstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten behandelt. Als mögliche Reaktionen der Endothelzellen wurde deren Proliferationsaktivität und die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Reagenzien und Geräte

Im folgenden werden tabellarisch Reagenzien und Geräte aufgelistet.

3.1.1 Zellkulturmedien

RPMI 1640 – Kulturmedium (Biochrom, Berlin)

Zusammensetzung (Angaben in mg/ml)

NaCl	6000	L-Methionin	15
KCl	400	L-Phenylalanin	15
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	1512	L-Prolin	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100	L-Serin	30
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100	L-Threonin	20
D-Glucose	2000	L-Tryptophan	5
Phenolrot	5	L-Tyrosin	20
NaHCO ₃	2000	L-Valin	20
L-Arginin	200	Glutathion	1
L-Asparagin	50	Biotin	0,2
L-Asparaginsäure	20	Vitamin B ₁₂	0,005
L-Cystein	50	D-Ca-Panthothenat	0,25
L-Glutamin	300	Cholinchlorid	3
L-Glutaminsäure	20	Folsäure	1
Glycin	10	Myoinositol	35
L-Histidin	15	Nicotinamid	1
L-Hydroxyprolin	20	p-Aminobenzoessäure	1
L-Isoleucin	50	Pyridoxol · HCl	1
L-Leucin	50	Riboflavin	0,2
L-Lysin · HCl	40	Thiamin · HCl	1

Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)

(Biochrom, Berlin)

Zusammensetzung (Angaben in mg/l)

NaCl	6400	L-Methionin	30
KCl	400	L-Phenylalanin	66
NaH ₂ PO ₄	124	L-Threonin	95
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200	L-Tryptophan	16
D-Glucose	1000	L-Tyrosin	72
Phenolrot	15	L-Valin	94
NaHCO ₃	3700	Glycin	30
Na-Pyruvat	110	L-Serin	42
Fe ₂ (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,1	Cholinchlorid	4
CaCl ₂	200	Folsäure	4
L-Arginin · HCl	84	Myoinositol	7,2
L-Cystein	48	Nicotinamid	4
L-Glutamin	580	D-Ca-Pantothenat	4
L-Histidin · HCl · H ₂ O	42	Pyridoxal · HCl	4
L-Isoleucin	105	Riboflavin	0,4
L-Leucin	105	Thiamin	4
L-Lysin · HCL	146		

Ansetzen des Endothelzell-Kulturmedium

Dem DMEM-Basismedium wurden 2 mmol/l Glutamin, 5 µmol/l β-Mercaptoethanol, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 10% fötales Kälberserum zugefügt.

3.1.2 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Accutase™	PAA, Cölbe
Aceton	Merck, Darmstadt
Benzylpenicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Blockierungslösung	Amersham, Braunschweig
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNP-BSA Komplex	Molecular Probes, Leiden, NL
EDTA (Versen) 1%	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Freundsches Adjuvans	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glutamin	Biochrom, Berlin
H ₃ PO ₄	Merck, Darmstadt
Heparin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
IL-4	R&D, Wiesbaden
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
LPS from Escherichia coli (Serotype 0111:B8)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
LPS from Salmonella abortus equi	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
LPS from Salmonella typhimurium	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
N-(1-Naphtyl)-Ethyldiamin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaNO ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumnitroprussid · 2H ₂ O	Riedel de Haen AG, Hannover
Natriumpyruvat	c.c.pro, Neustadt
Nicht-essentielle Aminosäuren	c.c.pro, Neustadt
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
TDI	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tesafilm®	Beiersdorf, Hamburg
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom, Berlin
Veet®	Reckitt & Colman, Hamburg
Waschlösung	Amersham, Braunschweig
DNA-Ladder	Gibco BRL, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Groß-Gerau
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tetramethylbenzidin + H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Schwefelsäure	Baker, Groß-Gerau
RNase-Inhibitor	Perkin-Elmer, Norwalk USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Reaktionsmix (zweifach konzentriert)	Gibco BRL, Karlsruhe
RT-Taq-Polymerase	In-vitro-gen, Groningen, NL
Freundsches Adjuvans	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.1.3 Antikörper

anti CD23: Rat Anti Mouse CD23: FITC markiert	Serotec, Eching
Isotypkontrolle: IgG2a: FITC markiert	Serotec, Eching
anti DNP-IgE, monoclonal, Clone SPE-7	Sigma, Deisenhofen
F(ab') ₂ Goat anti mouse IgG: FITC	Serotec, Eching
anti VCAM-1: Rat Anti Mouse VCAM-1: FITC markiert	Chemicon, Hofheim

3.1.4 Geräte

Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL, Karlsruhe
Transluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Labsystems Fluoroskan II heim	Flow Laboratories GmbH, Mecken-
MRX Microtiterplate reader	Dynatech Laboratories,
Kutimeter Art.-Nr. 7309	Mitutoyo, Neuss
Lamina Flow TL 2448	Kendro, Hamburg
Trockenschrank UM 100-800	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator Nuair NU 4500E	Zapf Instruments, Sarstedt
Mikroskop Zeiss Axiovert 25	Omnilab, Gerden
Zentrifuge Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Durchflußzytometer	Eppendorf, Hamburg

3.1.5 Kunststoffmaterial

25cm ² Kulturflaschen(Schräghals, Filterdeckel)	Greiner, Frickenhausen
96-well Kulturplatte	Greiner, Frickenhausen
CRYO-Röhrchen 1 ml	Greiner, Frickenhausen
96-well-Zellkulturplatten (für den Einsatz von fluoreszenzmarkierter Antikörper geeignet)	Costar, Bodenheim
Zellschaber	Costar, Bodenheim

3.1.6 Pufferlösungen

Im folgenden wird die Herstellung der verwendeten Pufferlösungen beschrieben.

3.1.6.1 PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline), 0,01 mol/l, pH 7,4

Wurde der Puffer als Waschpuffer in der Zellkultur verwandt, dann wurden vor dem Ansetzen der Lösung alle Glasgeräte für 2 Stunden bei 200 °C sterilisiert.

Zur Herstellung des Puffers wurden 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄ und 1,15 g Na₂HPO₄ in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst (pH 7,4). Zu diesem Puffer wurden 125 mg Dihydrostreptomycinsulfat und 600 mg Benzylpenicillin hinzugefügt. Vor Verwendung als Waschlösung in der Zellkultur wurde der Puffer autoklaviert.

3.1.6.2 TBE-Puffer (10x)

Zur Herstellung des TBE-Puffers wurden 1 mol/l Tris, 0,9 mol/l Borsäure und 0,01 mol/l EDTA in destilliertem Wasser gemischt.

3.1.6.3 MIF-Puffer (Membranimmunofluoreszenzpuffer zum Waschen und Verdünnen der Proben)

Zur Herstellung des Puffers wurden 5 g BSA und 0,1 g NaN₃ in 1 l PBS (pH 7,4) gelöst.

3.1.6.4 Trypanblau-Lösung

Zur Herstellung der Lösung wurden 40 mg Trypanblau in 10 ml Aqua. dest. gelöst. Danach wurde die Lösung in 100 µl Aliquots aufgeteilt.

3.2 Kultur von Zelllinien

Die Versuche wurden mit murinen Zelllinien durchgeführt, deren Kultivierung im folgenden kurz beschrieben werden.

3.2.1 Kultivierung von murine Keratinozyten, MSC-P5 (Cell Line Service, Heidelberg)

Bei MSC-P5-Zellen handelt es sich um Keratinozyten, die durch Transfektion mit dem Sarcoma Virus zu Tumorzellen transformiert wurden (WOODS et al., 1973).

Das Medium von subkonfluent bewachsenen 25 cm² Kulturflaschen wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit 2 ml EDTA-Lösung für eine Minute bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der Lösung wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flaschen pipettiert und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die CO₂-Konzentration im Brutschrank betrug 5 %. Die Zellsuspension wurde in Reagenzgläser überführt und bei 1000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml RPMI 1640-Medium (10 % fötales Kälberserum) resuspendiert. Bei der Routineumsetzung von MSC-P5-Zellen wurden 10 ml RPMI-Medium (10 % fötales Kälberserum) zugefügt. Pro 25 cm² Kulturflasche wurden 5 ml Zellsuspension ausgesät. Zwei Stunden nach der Aussaat wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Flaschen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und 5 ml neues Medium mit 10 % Kälberserum hinzugefügt.

Für Versuche, in denen Oberflächenmoleküle von Keratinozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen oder Zytokine in Zellkulturüberstand gemessen werden sollten, mußten die Zellen in 96-well Kulturplatten ausgesät werden.

Nach dem Abzentrifugieren der abgelösten Zellen aus 25 cm² Kulturflaschen wurde das Pellet in RPMI 1640 Medium (mit 10% fötalem Kälberserum) resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in 100 µl Trypanblaulösung pipettiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Suspension

auf eine Dichte von 200000 Zellen/ml RPMI 1640 (mit 10% Kälberserum) eingestellt und in 96-well Kulturplatten ausgesät.

Alle drei Monate wurden Keratinozyten eingefroren, um im Falle einer Kontamination der Zellen keimfreie Zellen aussäen zu können. Dazu wurde das alte Medium von subkonfluent bewachsenen 25 cm² Kulturflaschen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt eine Inkubation mit 2 ml EDTA-Lösung für eine Minute bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der Lösung wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flaschen pipettiert und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Reagenzgläser überführt und bei 1000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde in 1 ml in RPMI 1640-Medium mit 10 % DMSO resuspendiert und in Cryo-Röhrchen bei -180°C gelagert.

3.2.2 Kultivierung von b.End3-Zellen, murine Endothelzellen (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK)

Die Transfektion der Zellen mit Polyoma-Virus (SV129) führte zur Bildung der Zell-Linie. Durch Inkubation mit inflammatorischen Zytokinen können die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 induziert werden (MC HALE et al., 1999).

Das Medium von subkonfluent bewachsenen 25 cm² Kulturflaschen wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Nach Entfernen der Lösung wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flaschen pipettiert und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Reagenzgläser überführt und bei 150 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Endothelzell-Kultur-Medium resuspendiert. Für die routinemäßige Umsetzung wurde die Zellsuspension in 15 ml Kulturmedium verdünnt. Pro 25 cm² Kulturflasche wurden 5 ml Zellsuspension ausgesät. Zwei Stunden nach der Aussaat wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Flaschen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und 5 ml neues Medium mit 10 % Kälberserum hinzugefügt.

Für Versuche, in denen Oberflächenmoleküle von Endothelzellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen oder die Zellproliferation gemessen werden sollten, wurden die Zellen in 96-well Kulturplatten ausgesät.

Nach dem Abzentrifugieren der abgelösten Zellen aus 25 cm² Kulturflaschen wurde das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in 100 µl Trypanblaulösung pipettiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Suspension auf eine Dichte von 200000 Zellen/ ml Endothelzell-Kulturmedium eingestellt.

Alle drei Monate wurden Keratinozyten eingefroren, um im Falle einer Kontamination der verwendeten Zellen keimfreie Zellen aussäen zu können. Dazu wurde das alte Medium von subkonfluent bewachsenen 25 cm² Kulturflaschen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Nach Entfernen der Lösung wurde 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flaschen pipettiert und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Reagenzgläser überführt und bei 150 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde in Endothelzell-Kulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und in Cryo-Röhrchen bei -180°C gelagert.

3.2.3 Nachweis von Mykoplasmenfreiheit in Zellkulturüberständen

Da die Anwesenheit von Mykoplasmen in Zellkulturen die Versuche stören könnte, wurden in regelmäßigen Abständen Analysen des Zellkulturüberstandes mit einem Mykoplasmen-Detektionskit (VenorGeM®, Biochrom, Berlin) durchgeführt.

Rehydratation der Primer/Nukleotide und der Positivkontrolle mit sterilem deionisiertem Wasser laut Herstellerprotokoll.

Zur Probenvorbereitung wurden 100 µl Zellkulturüberstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und anschließend 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5 Sekunden., 13000 Umdrehungen/min.). Von der Lösung wurden 2 µl in den PCR-Test.

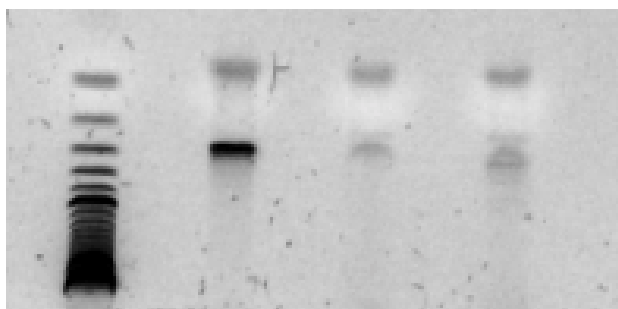
Für den PCR-Reaktionsmix wurden je Test 5 μ l 10x PCR Reaktionspuffer, 10 μ l Primer/Nukleotid sowie 1 U Taq DNA Polymerase gemischt und auf 48 μ l mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Zu je 48 μ l PCR-Reaktionsmix wurden entweder 2 μ l PCR-Proben, 2 μ l Positivkontrolle oder 2 μ l steriles, deionisiertes Wasser als Negativkontrolle hinzugefügt.

PCR-Thermocycler-Programm:

Im ersten Zyklus wurden die Proben für je zwei Minuten auf 94°C, 55°C und 72°C erhitzt. Anschließend folgten 34 Zyklen in denen die Proben 30 Sekunden auf 94°C, 60 Sekunden auf 55°C und 60 Sekunden auf 72°C erhitzt wurden. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben vier Minuten auf 72°C erhitzt und anschließend auf 4 bis 8 °C abgekühlt.

Herstellung des Agarosegels:

Für ein Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gegeben. Anschließend wurden 4 μ l Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Agarose-TBE-Lösung wurde aufgeköcht und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach ca. 20 Minuten war das Gel ausgehärtet. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer vollständig mit TBE-Puffer (1x) übergossen. Ein Probenvolumen von je 20 μ l wurde in die Auftragesaschen pipettiert. Bei einer angelegten Stromstärke von 100 mA wurden die DNA-Proben ca. 45 Minuten getrennt. Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden.



Std Pos Neg MSC-P5

Abbildung 1: Nachweis der Mykoplasmenfreiheit vom 4.10.2000 (Std = DNA-Ladder, Pos = positive Kontrolle, Neg = negative Kontrolle, MSC-P5 = Überstand der verwendeten Keratinozyten)

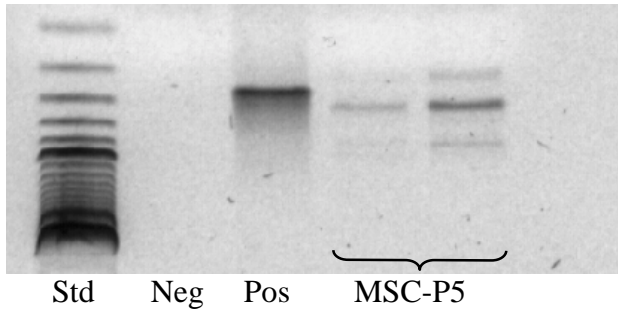


Abbildung 2: Nachweis der Mykoplasmenfreiheit vom 26.04.2001 (Std = DNA-Ladder, Pos = positive Kontrolle, Neg = negative Kontrolle, MSC-P5 = Überstand der verwendeten Keratinozyten)

Es war keine DNA-Bande auf der Höhe der Positivkontrolle zu erkennen (Abb. 1 u. 2). Daher wurde von mykoplasmenfreien MSC-P5-Zellkulturen ausgegangen.

3.2.4 Bestimmung der Zellvitalität

Die Untersuchung wurde mit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Mannheim) durchgeführt. Da zytotoxische Effekte die Versuchsergebnisse beeinflusst hätten, sollte während den Untersuchungen die Zellvitalität nicht absinken. Daher wurde parallel zu den Versuchen jeweils die Vitalität der Zellen bestimmt.

Tetrazoliumsalze werden oft für die Detektion von Enzymaktivitäten verwendet, bei der Reduktionsäquivalente gebildet werden. Gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz wird durch Reduktion zu einem wasserunlöslichen blau/violetten Formazan umgesetzt. Vitale Zellen setzen während dieses Tests das Tetrazoliumsalz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] zu violetter Formazan um. Für die Umwandlung ist die Aktivität der Dehydrogenase, die NADPH oder NADH bildet, essentiell (BERRIDGE und TAN, 1993).

Pro Kavität wurden 20 µl der CellTiter 96® AQueous One Solution zu 100 µl Zellkulturüberstand gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C im Brutschrank wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

3.2.5 Kalibrierung der Formazanbildung mit der Zellzahl

Um die Extinktion der Vitalitätsmessungen auf eine Zellzahl beziehen zu können, muß eine Kalibrierungsreihe der MSC-P5-Zellen angelegt werden.

Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von 40000 Zellen/cm² eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in Verdünnungen von 10, 20, 30, 50, 100 und 200 µl ad 200 µl Zellmedium in eine Mikrotiterkulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen entweder mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt oder die Vitalität der Zellen mit der Cell-Titer-Methode gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils sechs unterschiedlichen Messungen dargestellt (Abb. 3).

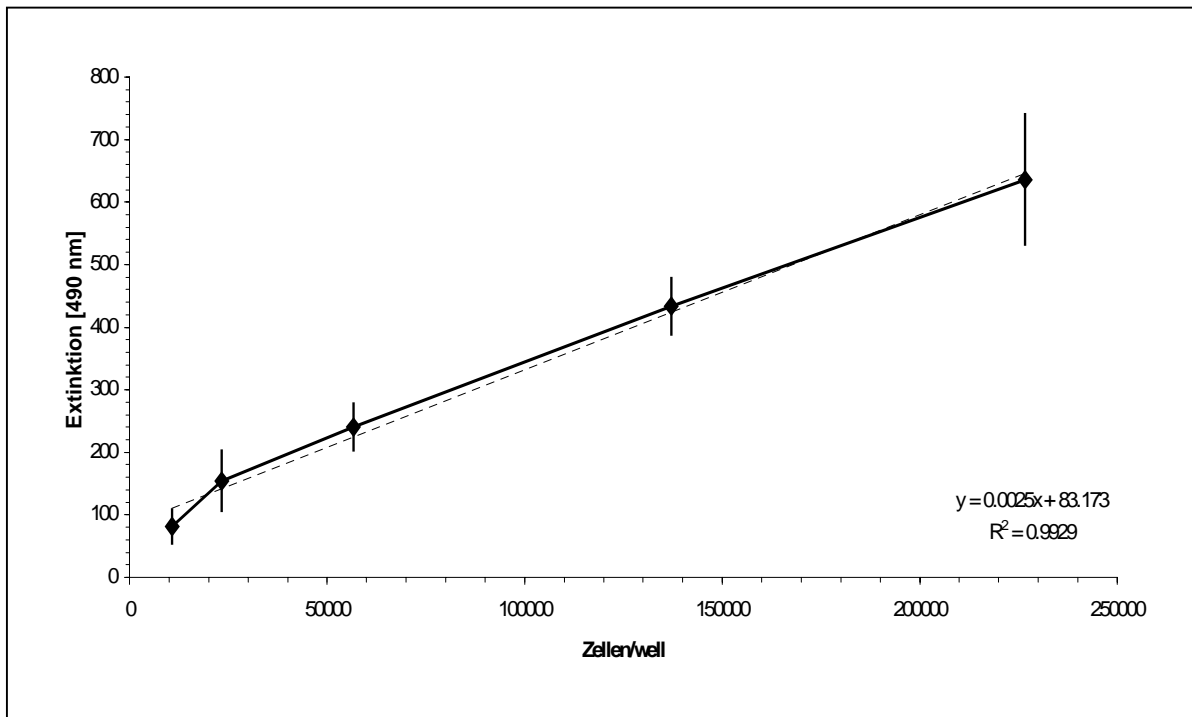


Abbildung 3: Messung der Vitalität in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl. Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung von sechs einzelnen Messungen.

Mit Hilfe der Kalibrierungsgleichung $y = 0,0025 x + 83,173$ kann die Extinktion der Vitalitätsmessung einer Zellzahl zugeordnet werden.

3.2.6 Bestimmung der Wachstumskurve der MSC-P5-Zellen und bend.3-Zellen

Das Wachstum von Zellkulturen lässt sich in drei Phasen unterteilen. Nach dem Aussäen beginnt die Adaptionsphase (lag-Phase), in der sich die Zellen nach der Umsetzung an die neuen Bedingungen gewöhnen müssen. Diese Phase ist durch eine geringe Proliferationsaktivität der Zellen gekennzeichnet. Unter günstigen Wachstumsbedingungen vermehren sich dann die Zellen sehr schnell. Diese Phase wird exponentielle Wachstumsphase oder log-Phase genannt. Die anschließende stationäre Phase wird durch Erschöpfung der Nahrungsquellen, Akkumulation giftiger Stoffwechselprodukte oder zu hoher Zelldichte eingeleitet (KLEINIG und SITTE, 1992). Zellversuche sollten während der log-Phase durchgeführt werden.

Die MSC-P5-Zellen wurden in einer Dichte von 40000 Zellen/cm² in einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zelldichte der bend.3-Zellen betrug während der Aussaat 80000 Zellen / cm². Nach 2, 24, 48, 72 und 144 h wurde die Zellzahl mit der Cell-Titer-Methode bestimmt. Dabei wurden je 100 µl Zellmedium 10 µl Farblösung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C wurde der Überstand in eine neue 96-well-Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Extinktionen wurden mit der vorab ermittelten Kalibrierungsgleichung auf die Zellzahl umgerechnet (vgl. 3.2.5)

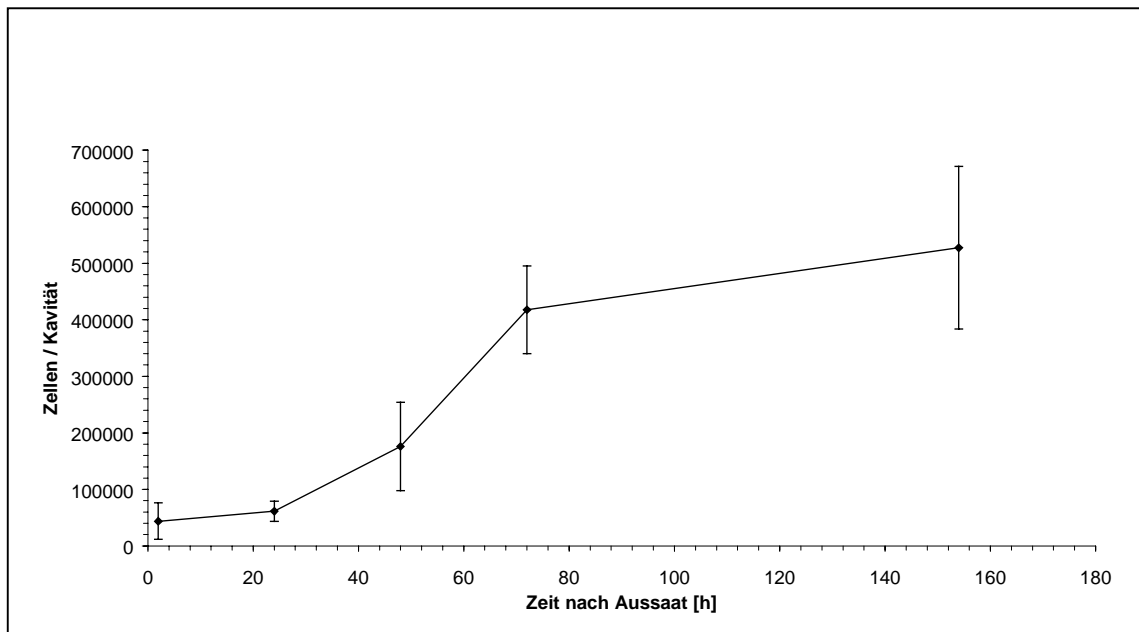


Abbildung 4: Zellzahl (MSC-P5-Zellen) in Abhängigkeit der Zeit nach der Aussaat. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs einzelnen Messungen.

Für MSC-P5-Zellen endete die Adaptionphase (lag-Phase) 24 Stunden nach der Aussaat. Danach begann die log-Phase, die sich über 48 Stunden erstreckte. Die anschließende stationäre Phase war nur durch einen leichten Anstieg der Zellzahl gekennzeichnet (Abb. 4). Für die weiteren Versuche ergab sich daraus die Forderung, dass die Zugabe von Substanzen 24 Stunden nach der Aussaat der MSC-P5-Zellen beginnen sollte.

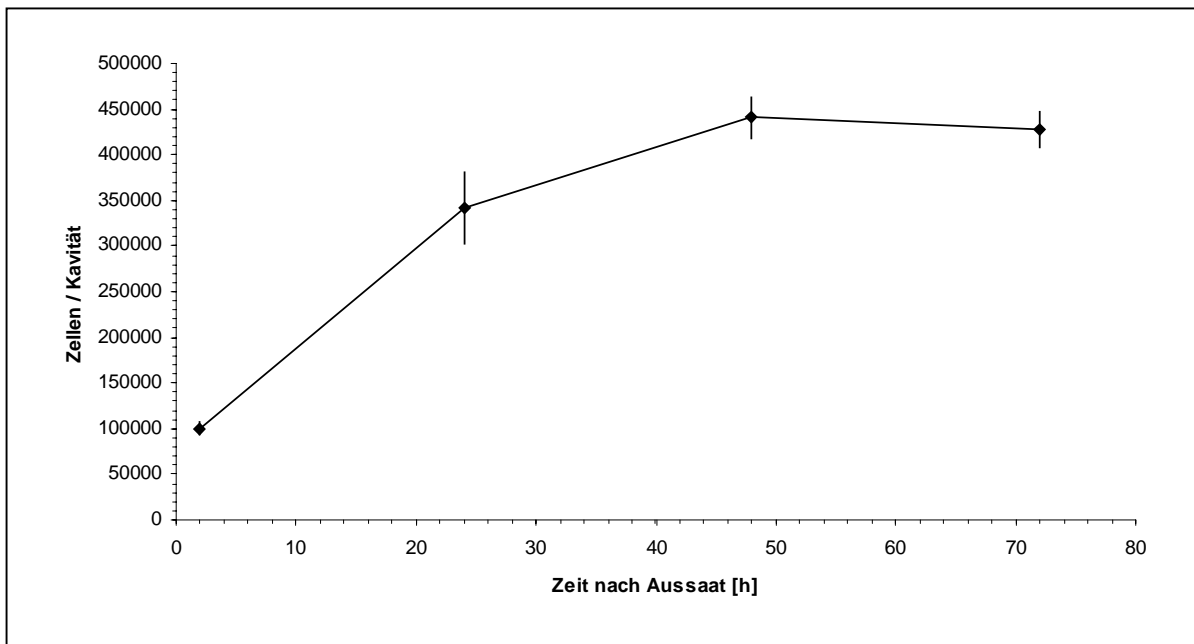


Abbildung 5: Zellzahl (bend.3-Zellen) in Abhängigkeit der Zeit nach der Aussaat. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs einzelnen Messungen.

Die Versuche mit bend.3-Zellen mussten innerhalb von 48 Stunden durchgeführt werden, da schon binnen zwei Stunden nach der Aussaat der bend.3-Zellen eine vermehrte Teilungsaktivität der Endothelzellen einsetzte (Abb. 5). Die stationäre Wachstumsphase begann 48 Stunden nach der Aussaat.

3.3 Nachweismethoden für Zytokine, Rezeptoren und Membranproteine

Im folgenden werden Methoden beschrieben um Mediatoren, die von passiv sensibilisierten Keratinozyten gebildet werden, intrazellulär und im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Desweiteren werden die angewandten Methoden beschrieben, um Membranproteine nachzuweisen.

Tabelle 1: Auflistung der angewendeten Nachweismethoden

Methode	Nachweis von:
Griess-Test	NO
RT-PCR	FcεRI, FcεRII, TNFα
Zytokin-ELISA	IL-1β, IL-10
FITC-markierte Antikörper	FcεRII, VCAM-1, FcγR
TNFα-DuoSet	TNFα
Durchflußzytometer	FcεRII

3.3.1 Stickstoffmonoxid-Bestimmung

Die Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung wurde anhand der Freisetzung von Stickstoffmonoxid untersucht. Der Nachweis wurde mit dem kolorimetrischen Griess-Test durchgeführt. Da NO nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden besitzt und in wässriger Lösung eine stabile Nitritlösung bildet, wurde zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid der Nitrit-Gehalt gemessen. Mit Sulfanilsäure bildet Nitrit Diabenzolsulfonsäure, die mit α-Naphthylamin zu einem rotem Farbstoff komplexiert.

50 µl Griess-Reagenz 1 (1% Sulfanilamid in H₃PO₄ 5 %) und 50 µl Griess-Reagenz 2 (0,1 % Naphthylethylendiamin in Aqua dest.) wurden nacheinander in die Kulturplatte zu 100 µl Zellüberstand pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.3.1.1 Kalibrierung des Griess-Tests

Für die Kalibrierung der Messung wurde anstelle von 100 µl Zellkulturüberstand Natriumnitritlösung (NaNO₂) verwendet. Die eingesetzten Verdünnungen waren: 0 / 0,156 / 0,3125 / 0,625 / 1,25 / 2,5 / 5 und 10 nmol/l RPMI 1640-Medium (10 % fötales Kälberserum).

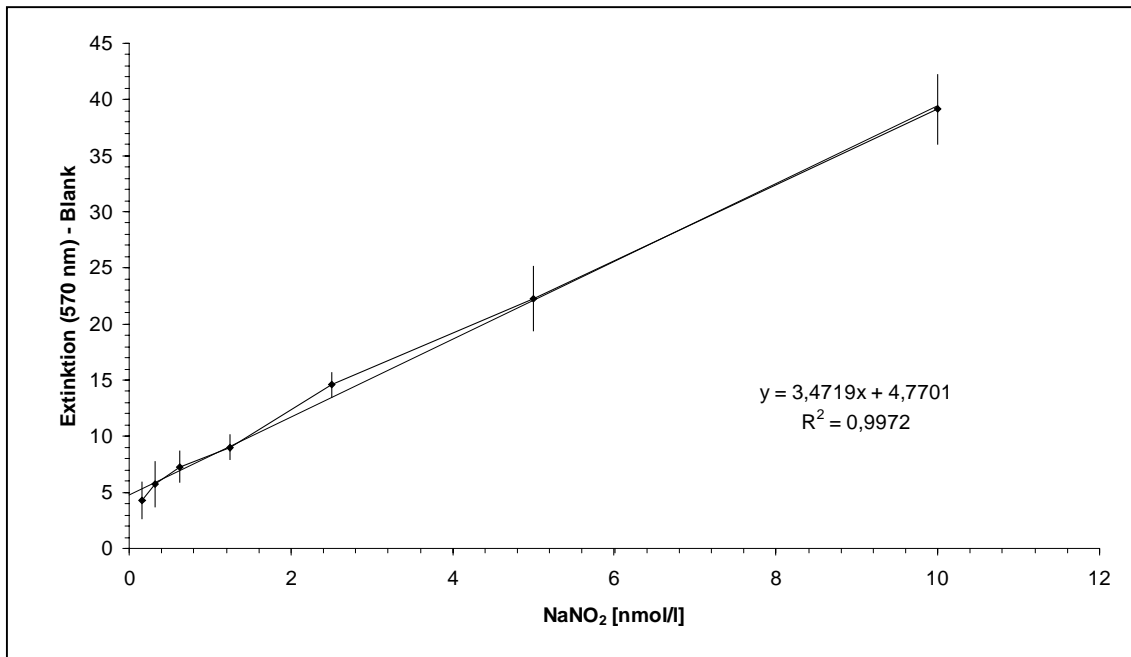


Abbildung 6: Kalibrierung des Griess-Tests mit NaNO₂. Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung von sechs einzelnen Messungen.

Zur Berechnung der absoluten NO₂ Konzentration aus der Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm wurde die Formel: $y = 3,471 x + 4,7701$ verwendet (Abb. 6).

3.3.2 Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch MSC-P5-Zellen

Stickstoffmonoxid wurde als erster Parameter herangezogen, um die Reaktion von Keratinozyten in Folge einer passiven Sensibilisierung zu messen. Zunächst mußte jedoch die Fähigkeit der MSC-P5-Zellen zur Bildung und Freisetzung von NO durch bekannte Stimulantien (Lipopolysaccharide und Natriumnitroprussid) nachgewiesen werden.

3.3.2.1 Behandlung von MSC-P5-Zellen mit LPS (Lipopolysacchariden)

Die MSC-P5-Zellen wurden in eine 96-well-Mikrotiterkulturplatte in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das alte Kulturmedium entfernt und anschließend Medium, welches LPS verschiedener Species enthielt, den Zellen zugefügt. Die jeweilige Konzentration der eingesetzten Lipopolysaccharide betrug 100 µg/ml serumhaltiges RPMI 1640-Medium. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Stickstoffmonoxidmenge mittels Griess-Test bestimmt.

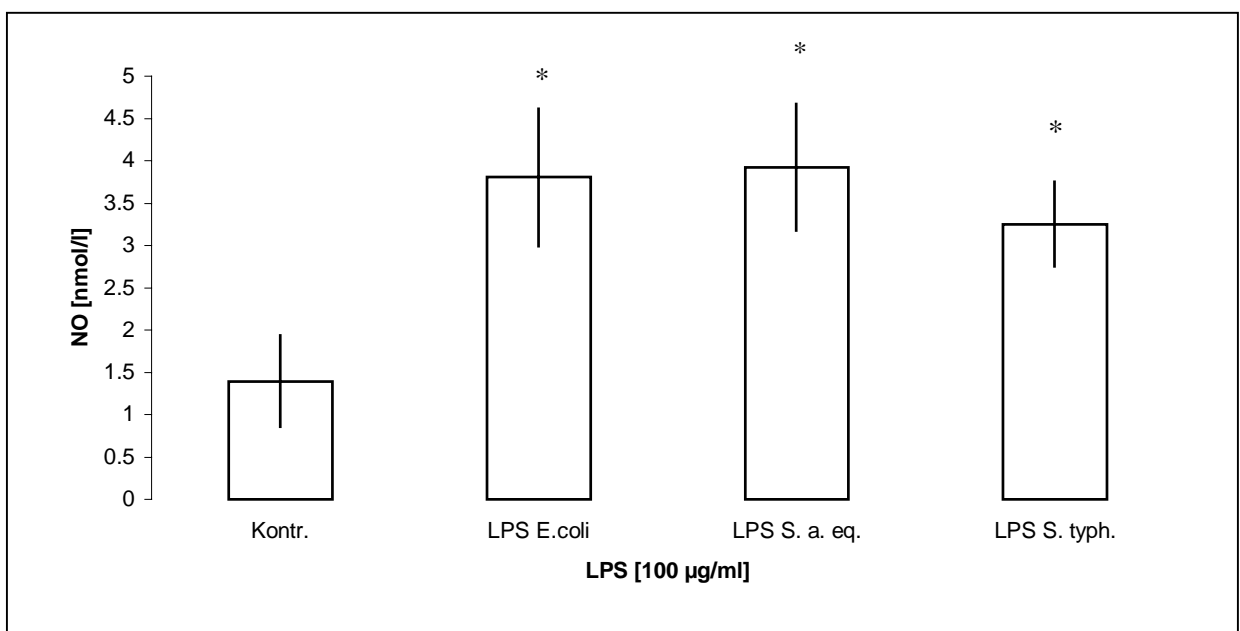


Abbildung 7: LPS-induzierte NO-Bildung bei Keratinozyten (MSC-P5). Bestimmung der NO-Konzentration mittels Griess-Test. LPS E.coli = LPS Escherichia coli, LPS S. a. eq. = LPS Salmonella abortus equi, LPS S. typh. = LPS Salmonella typhimurium. Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung aus sieben einzelnen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Kontrolle.

Während in der unbehandelten Kontrollgruppe ein NO-Wert von 1,4 (\pm 0,54) nmol/l gemessen wurde, konnte dieser Wert durch die Vorbehandlung der Keratinozyten mit LPS deutlich gesteigert werden. Eine Behandlung der Zellen mit LPS von E.coli und S. a. eq. führten zu einer NO-Bildung von 3,8 (\pm 0,81) bzw 3,9 (\pm 0,75) nmol/l. LPS von S. typh. hatte einen abgeschwächten Effekt (3,3 (\pm 0,50) nmol/l). Die Ergebnisse zeigen, dass Keratinozyten zur Freisetzung von NO stimuliert werden können (Abb. 7). Der Griess-Tests ist ausreichend sensitiv, um die freigesetzte NO-Menge nachzuweisen.

3.3.2.2 NO-Freisetzung aus Keratinozyten nach Behandlung mit Natriumnitroprussid

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die MSC-P5-Zellen zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid fähig sind, sollte die dosisabhängige Sensitivität der Zellen gegenüber Natriumnitroprussid untersucht werden.

Die MSC-P5-Zellen wurden in eine 96-well-Mikrotiterkulturplatte in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das alte Kulturmedium entfernt und anschließend natriumnitroprussidhaltiges Medium den Zellen zugefügt. Die eingesetzten Konzentrationen betragen: 0 / 0,1 / 1 / 10 / 100 und 1000 µmol/l. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Stickstoffmonoxid-Konzentration mit dem Griess-Test bestimmt.

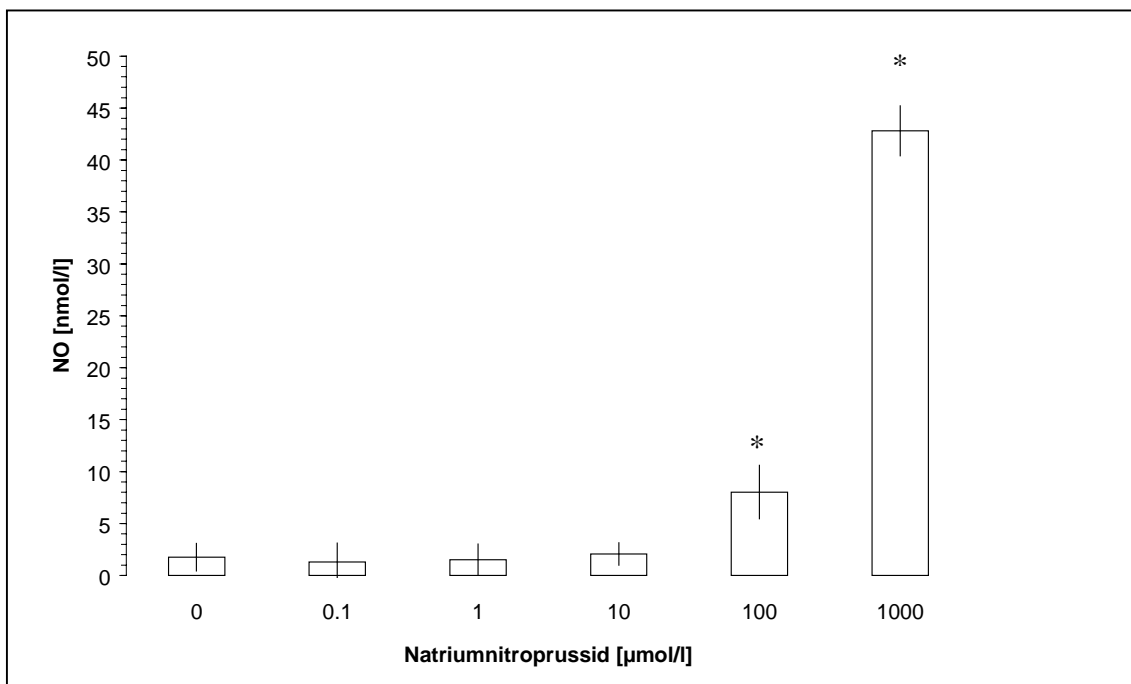


Abbildung 8: Natriumnitroprussid-induzierte NO-Freisetzung bei MSC-P5-Zellen, gemessen mittels Griess-Test. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf einzelnen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu 0 µmol/l Natriumnitroprussid.

In der unbehandelten Kontrollgruppe wurde eine NO-Menge von 1,75 (\pm 1,33) nmol/l nachgewiesen. Wurden die Keratinozyten mit Natriumnitroprussid inkubiert, änderte sich bis zu einer eingesetzten Konzentration von 10 µmol/l die freigesetzte Stickstoffmonoxid-

menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht. Bei einer eingesetzten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde ein NO-Wert von 8 nmol/l ($\pm 2,57$) gemessen. Wurden die Keratinozyten mit 1000 $\mu\text{mol/l}$ Natriumnitroprussid inkubiert, wurden 42,8 ($\pm 2,41$) nmol/l NO gemessen (Abb. 8). Der Nachweis von NO mittels Griess-Test ist ausreichend sensitiv, um eine dosisabhängige NO-Freisetzung von NO hervorgerufen durch die Behandlung von MSC-P5-Zellen mit Natriumnitroprussid zu zeigen.

3.3.3 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR sollte die mRNA für Fc ϵ RI und Fc ϵ RII bei MSC-P5-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde mit dieser Methode mRNA für TNF α als Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung nachgewiesen.

Die Extraktion wurde mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab, Erlangen) durchgeführt, weil sowohl die Gesamt-RNA als auch intrazelluläre Proteine extrahiert werden können.

3.3.3.1 Isolierung der RNA

Die RNA, die nach dieser Methode extrahiert wurde, ist DNA- und proteinfrei.

Durch die Zugabe von 3,0 ml peqGOLD TriFast™ und anschließendes mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette wurden die Zellen lysiert. Eine unzureichende Menge an peqGOLD TriFast™ kann zur Kontamination der extrahierten RNA mit DNA führen.

Die Proben wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurden 600 μl Chloroform zugegeben und die Proben 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 3 bis 10 Minuten wurden die Proben bei 12000 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, wobei sich die Proben in drei unterschiedliche Phasen trennten:

- untere rote Phenol-Chloroform-Phase
- obere farblose wässrige Phase (ca. 60% des Gesamtvolumens)
- dazwischenliegende Interphase

Die RNA war ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Phenolphase befanden. Die wässrige Phase wurde in ein Röhrchen überführt und die Phenolphase bis zur Extraktion der Proteine bei 4°C gelagert. Durch das Hinzufügen von 1,5 ml Isopropanol erfolgte die Präzipitation der RNA. Die Probe wurde

gemischt und für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Probe bei 12000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, wobei sich RNA-Präzipitat (gelartige Konsistenz) an der Unterseite des Zentrifugenröhrchens ablagerte. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 12000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet. Jedoch verschlechtert ein vollständiges Trocknen des Pellets die Löslichkeit der RNA. Die RNA wurde in 30 µl 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC-Wasser) gelöst. DEPC verhindert die Kontamination mit RNasen.

3.3.3.2 Isolierung von intrazellulären Proteinen

Nach dem vollständigen Entfernen der wäßrigen Phase wurde die DNA durch die Zugabe von 0,3 ml 100 %-igem Ethanol präzipitiert. Die Proben wurden durch mehrmaliges Kippen gut gemischt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach anschließender Zentrifugation bei 2000 g für 5 Minuten bei 4°C sedimentierte die DNA. Durch die Zugabe von 1,5 ml Isopropanol zum Phenol/Ethanol-Überstand wurden die Proteine präzipitiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12000 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Proteinpellet dreimal mit 2 ml 0,3 mol/l Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden für 20 Minuten in der Waschlösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 7500 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 2 ml 100 %-igem Ethanol gefällt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 7500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das Protein-Pellet getrocknet. Durch die Zugabe von 1 % SDS wurde das Pellet durch Auf- und Abziehen mit einer Pipette vollständig gelöst. Da das Pellet aus löslichen Proteinen und unlöslichen Komponenten (Membranreste, extrazelluläres Material) bestand, wurden die unlöslichen Bestandteile durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 g bei 4°C entfernt. Die Proteinlösung wurde bei -20°C gelagert.

3.3.3.3 Durchführung der RT-PCR

Zunächst wurden die RNA der Proben auf DNA-Kontamination untersucht. Dazu wurden die Proben auf ein Abschätzel gel aufgetragen.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gegeben. Anschließend wurden 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Agarose-TBE-Lösung wurde aufgeköcht und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach ca. 20 Minuten war das Gel ausgehärtet. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer vollständig mit TBE-Puffer (1x) übergossen. 2 µl der gelösten RNA-Probe wurden in 2,5 µl Stoppuffer (10x) gegeben. Anschließend wurde die Lösung mit DEPC-Wasser (0,01 %) auf 20 µl aufgefüllt. Ein Probenvolumen von je 20 µl wurde in die Auftragesaschen pipettiert.

Bei einer angelegten Stromstärke von 100 mA wurden die RNA-Proben ca. 45 Minuten getrennt. Unter UV-Licht konnten die RNA-Banden sichtbar gemacht werden.

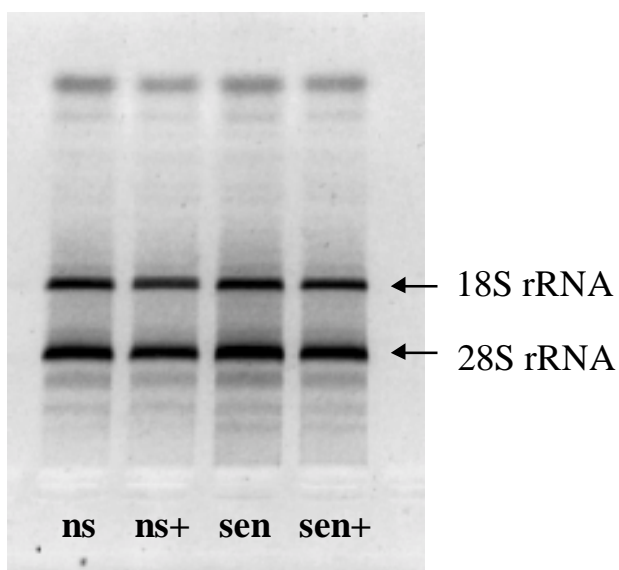


Abbildung 9: Foto der Gelabschätzung. *ns* = nicht sensibilisierte Keratinozyten, *ns+* = nicht sensibilisierte aber mit TDI inkubierte Keratinozyten, *sen* = sensibilisierte Keratinozyten, *sen+* = sensibilisierte und mit TDI inkubierte Keratinozyten.

Auf dem Foto der Gelabschätzung (Abb. 9) sind deutlich die beiden ribosomalen RNA-Banden zu erkennen. Die Banden der unterschiedlichen Gruppen erscheinen sehr gleichmäßig, so dass von einem identischen RNA-Gehalt der Proben ausgegangen werden kann.

3.3.3.3.1 mRNA-Nachweis von TNF α , Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, GAPDH

RT-PCR wurde durch mit dem superscript™ one-step™ RT-PCR system (GIBCO BRL; Burlington, Ontario, Canada) durchgeführt. Der RNase-Inhibitor mit einer Aktivität von 8 U/50 μ l wurde zum RT-PCR-Ansatz hinzugefügt.

Für die mRNA-Nachweis von TNF α , Fc ϵ RI, Fc ϵ RII, GAPDH wurden folgende Primer verwendet:

Primer für GAPDH

- „sense primer“: 5'tga agg tcg gtg tga acg gat ttg gc 3'
- „antisense primer“: 5'cat gta ggc cat gag gtc cac cac 3'

Die Größe des Amplifikats betrug 983 bp.

Primer für TNF α

- „sense primer“: 5'gat cat ctt ctc aaa att cga gtg 3'
- „antisense primer“: 5'tcc tgg tat gag ata gca aat cgg 3'

Die Größe des Amplifikats betrug 259 bp.

Primer für Fc ϵ RI

- „sense primer“: 5'cca cct gcc taa gat gc cct tgc 3'
- „antisense primer“: 5'gat cca caa tgg tac cgt ctc tga gg 3'

Primer für Fc ϵ RII

- „sense primer“: 5'gca cgc ctc atc act gaa agg 3'
- „antisense primer“: 5'ggg ttc act ttt tgg ggt 3'

Für den RT-PCR-Ansatz wurden zu je 1 μ l Probenvolumen 25 μ l 2 x Mix-Puffer, 19,7 ml DEPC-Wasser, 0,4 μ l RNase-Inhibitor, je 1 μ l Primer („sense“ und „antisense“) und 0,9 μ l RT-Taq-Mix hinzugefügt.

Die reverse Transkription wurde bei einer Temperatur von 50°C über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 15 minütiges Erhitzen der Proben auf 94°C beendet. Die „annealing“-Temperatur betrug 55°C und wurde über eine Minute

durchgeführt. Danach schloß sich eine einminütige Polymerisation bei einer Temperatur von 72°C an.

Zum Nachweis von GAPDH wurde der Zyklus 18-mal wiederholt, während für die Bestimmung von TNF α eine 42-malige Wiederholung erforderlich war. Für Fc ϵ RI und Fc ϵ RII wurde der Zyklus 24-mal wiederholt.

3.3.4 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit wurde ein **Brom-desoxyuridin** (BrdU) ELISA (Cell Proliferation ELISA system, Version 2 (Amersham, Freiburg)) verwendet. Die Voraussetzung für diesen Test ist eine proliferierende Zellkultur. Dabei wird BrdU anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Dieses BrdU wird von einem Antikörper erkannt, an dem eine Peroxidase konjugiert ist. Die Peroxidase setzt das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) um. Die Aktivität des gekoppelten Enzyms wird anhand des Farbumschlags registriert.

Herstellung der Gebrauchslösungen laut Herstellerangabe:

- Anti-BrdU-Peroxidase: Das Lyophilisat wurde in 1,1 ml destilliertem gelöst. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde die Antikörperlösung 1:100 mit Antikörperverdünner verdünnt.
- BrdU-Markierungsreagenz: Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde das Konzentrat (10 mmol/l) auf eine Konzentration von 20 μ mol/l mit Kulturmedium verdünnt.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen in 96-well-Kulturplatten in einer Dichte von 40000 Zellen/cm² ausgesät. Nach Auslösen des Proliferationsreizes und einer Inkubationsphase wurde der BrdU-Test durchgeführt. Zunächst erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem BrdU-Markierungsreagenz. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurde das Reagenz entfernt und Fixationsmittel zugefügt. Das hinzugefügte Volumen betrug 200 μ l pro Kavität. Nach 30 Minuten wurde die Fixierlösung entfernt und die freien Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte mit dem Blockierungsreagenz besetzt. Das hinzugefügte Volumen des Blockierungsreagenzes betrug 200 μ l pro Kavität. Nach 30 Minuten wurden 100 μ l peroxidase-konjugierter BrdU-Antikörper in jede Kavität

pipettiert. Nach 90 Minuten wurden die ungebundenen Antikörper entfernt und die Mikrotiterplatte dreimal mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen. Von der Substratlösung wurden jeweils 100 μ l in jede Kavität pipettiert. Der Farbumschlag wurde nach ca. 15 Minuten deutlich. Danach wurden zum Abbrechen der Reaktion in jede Kavität 25 μ l Stop-Reagenz pipettiert. Innerhalb von 5 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Extinktionen der Versuchsgruppen wurden auf die Kontrolle bezogen.

3.3.5 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Protein Assay von Bio-RAD (München) durchgeführt.

Zu je 10 µl Proteinlösung (gewonnen während der Aufarbeitung der Keratinozyten für die RT-PCR) wurden 290 µl verdünnte Färbelösung (20 % v/v) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

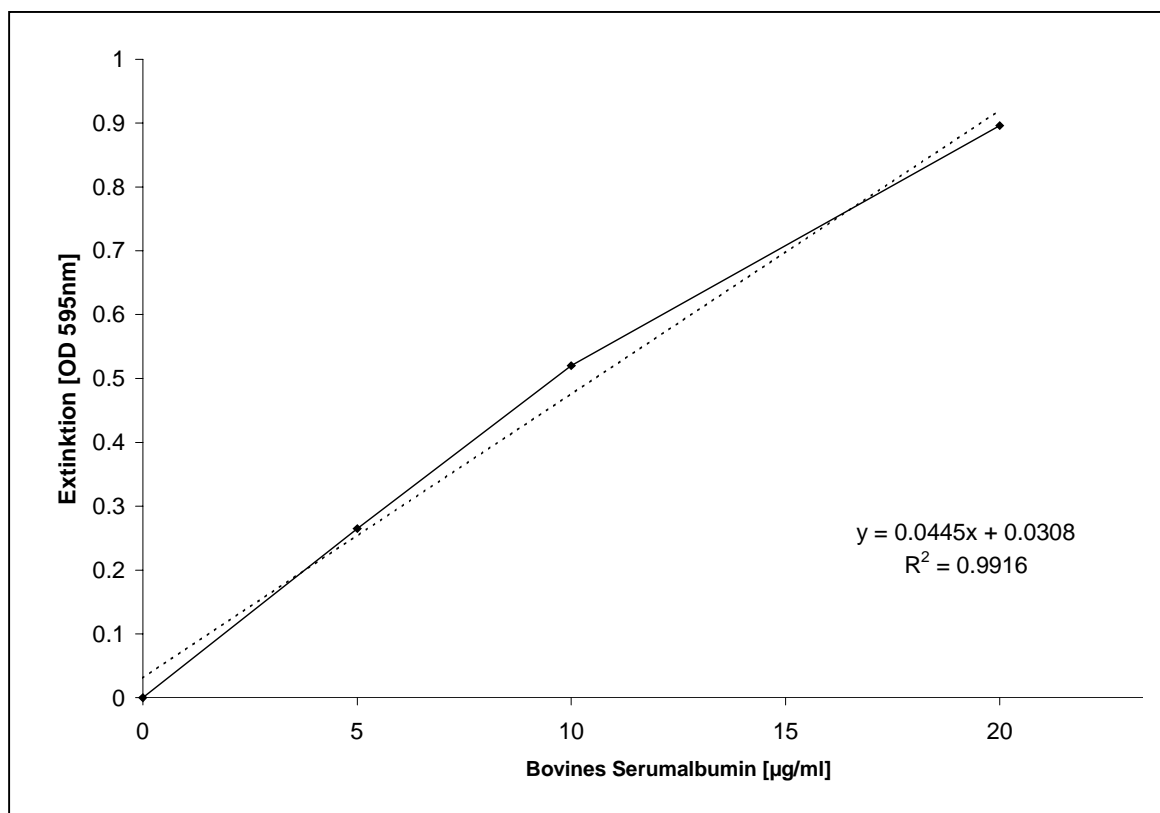


Abbildung 10: Kalibrierung der Proteinmessung. Als Standard wurde bovines Serumalbumin verwendet.

Die Kalibrierungsgerade hatte die Gleichung: $y = 0,0445 x + 0,0308$ (Abb. 10).

3.3.6 Zytokin-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine IL-1 β und IL-10 wurden Quantikine® M-ELISA (R&D, Wiesbaden) verwendet.

Alle Reagenzien wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. In die antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte wurden zunächst 50 μ l Probenverdünnungslösung pipettiert. Anschließend wurden 50 μ l der Standardlösungen bzw. der Proben hinzugefügt. Der Standard wurde in den Konzentrationen 0 / 7,8 / 15,6 / 31,2 / 62,5 / 125 / 250 und 500 pg/ml RPMI 1640-Medium (10 % FKS) eingesetzt.

Es folgte eine Inkubationsphase von zwei Stunden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit 400 μ l Waschlösung/Kavität gewaschen. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Danach wurden 100 μ l von der meerrettichkonjugierten Antikörperlösung in jede Kavität pipettiert. Nach zwei Stunden wurde die Mikrotiterplatte wieder mit 400 μ l Waschlösung pro Kavität gewaschen. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Anschließend wurden 100 μ l des Farbreagenzes in jeden Ansatz gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sie vor direktem Lichteinfall geschützt wurde. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 mol/l) unterbrochen. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Nachweisgrenzen der eingesetzten ELISA lagen bei 3 pg Zytokin/ml Zellkulturüberstand.

3.3.7 Bestimmung der TNF α -Konzentrationen

Die TNF α -Konzentrationen wurden mit einem Mouse TNF α -DuoSet (R&D, Wiesbaden) bestimmt.

Die benötigten Lösungen wurden laut Herstellerangabe hergestellt.

18 Stunden vor der Durchführung des Tests wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 μ l Detektionsantikörperlösung (0,55 % v/v)/Kavität bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde der nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit der Waschlösung (300 μ l/Kavität) gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden anschließend durch Zugabe von 300 μ l Blockierungslösung/Kavität maskiert. Nach einer Stunde

wurde die Blockierungslösung entfernt und 100 µl Probe bzw. Standardlösung/Kavität hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Lösungen entfernt und die Mikrotiterplatte mit 300 µl Waschlösung/Kavität dreimal gewaschen. Zur Detektion wurden pro Kavität 100 µl Streptavidin-HRP gekopplerter Antikörper (0,5 % v/v) verwendet. Nach 20 Minuten wurde die Platte abermals dreimal mit Waschlösung (300 µl/Kavität) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Substrat (Tetramethylbenzidine + H₂O₂)/Kavität hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl/Kavität der Stopplösung (1 mol/l H₂SO₄) unterbrochen. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

3.4 Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen mit Toluylen-2,4-diisocyanat (TDI) - Mouse Ear Swelling Test – MEST

Die Mäuse dienten als Spender für sensibilisiertes Blutplasma. Das Blutplasma wurde anschließend zur passiven Sensibilisierung der Keratinozyten verwendet.

Für die Sensibilisierung wurden weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von acht Wochen (~ 20 g) (Charles River, Sulzfeld) verwendet.

Alle Tiere waren klinisch gesund, wurden in Gruppen zu je 4 Mäusen bei 22°C mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und mit Wasser sowie einer Standarddiät (Altromin, Lage/Lippe) *ad libitum* versorgt.

Nach der Eingewöhnungsphase von einer Woche erfolgte eine aktive Sensibilisierung gegenüber TDI (in Anlehnung an GAD et al., 1986). Zu Beginn wurde die Bauchhaut rasiert und mit einer Enthaarungscreme (Veet®) behandelt. Anschließend erfolgte eine einmalige intrakutane Applikation von 50 µl Freundesches Adjuvans. Die Hornschicht der Bauchhaut wurde durch zehnmaliges Strippen mit Tesafilm® entfernt. Danach wurden über einen Zeitraum von vier Tagen jeweils 100 µl 5% TDI in Aceton lokal auf die Epidermis pipettiert. Nach zehn Tagen wurde die Allergenisierung durch Auftragen von 20 µl 0,5% TDI in Aceton auf die Innen- und Außenflächen der linken Ohren überprüft (Challenge). Die

rechten Ohren, die als Kontrollohren fungierten, wurden nur mit 20 μ l Aceton (Vehikel) behandelt. Für die Messung der Ohrdicke wurde ein Kutimeter verwendet. Der Basiswert, auf den die nachfolgenden Messwerte bezogen wurden, wurde einen Tag vor der TDI-Gabe (Challenge) ermittelt. 24 und 48 Stunden nach der Challenge-Reaktion wurde die Ohrdicke bestimmt. Die prozentuale Schwellung wurde durch den Vergleich der Werte vor TDI-Behandlung mit jenen 24 Stunden danach ermittelt. Für die Plasmagewinnung wurden nur Tiere verwendet, die eine Schwellung von mindestens 20 % zeigten.

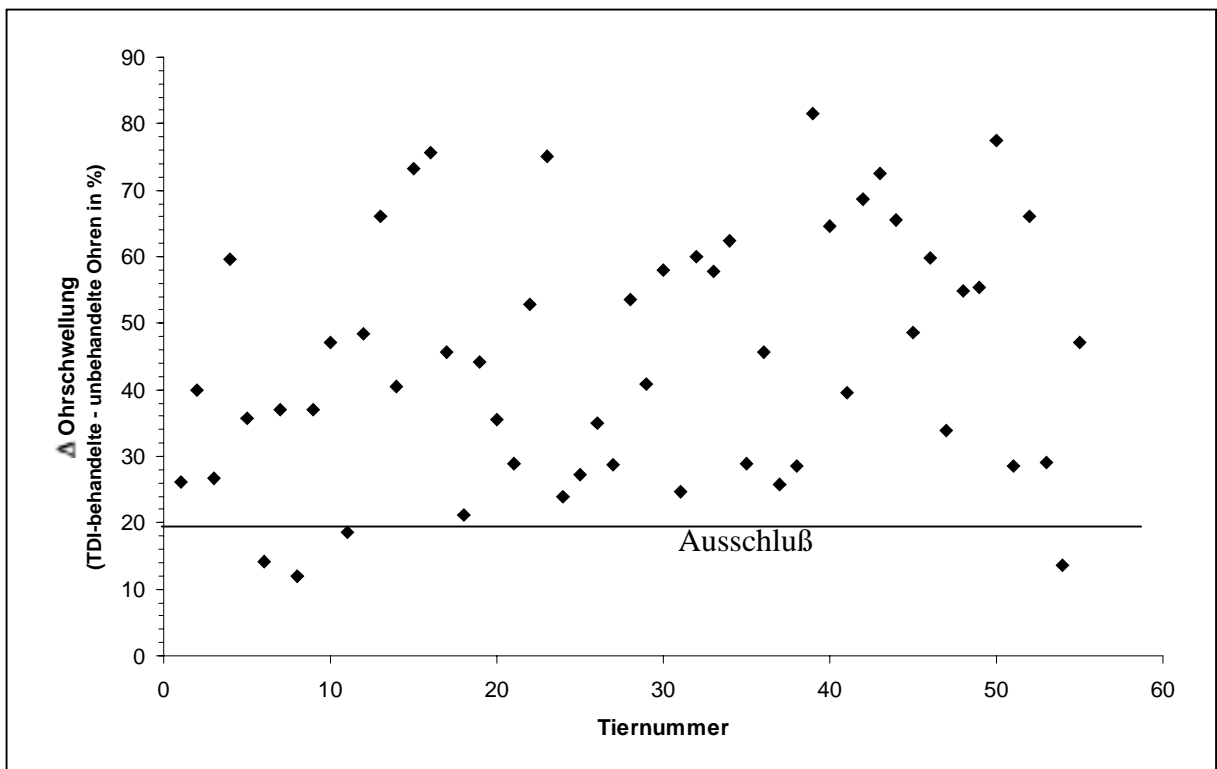


Abbildung 11: MEST-Test zur Detektion sensibilisierter Mäuse. Messung der Ohrschwellung mit Kutimeter. Werte bezogen auf die Basiswerte der Ohrdicken, die vor der Challenge-Reaktion ermittelt wurden.

Nach Auswertung der Meßergebnisse reagierten 90% der Mäuse allergisch auf TDI (Abb. 11). Von diesen Mäusen wurde das Plasma zur späteren Behandlung von Keratinozyten gewonnen. Das Blut wurde in heparinisierten (20 I.E./ml Blut) Röhrchen aufgefangen und bei 3000 g zentrifugiert. Während das Pellet verworfen wurde, wurde der Überstand von allen Mäusen gesammelt und aliquotiert. Anschließend wurde das Plasma bei -180°C gelagert.

Liste der Zellkulturversuche

Nr	Zellen	Fragestellung	Meßmethode
3.5.1	Welche Immunglobulin-bindende Rezeptoren sind auf Keratinozyten vorhanden ?		
	MSC-P5	CD 23 vorhanden? Durch IL-4 stimulierbar?	Fluoroskan II, Durchflußzytometer, RT-PCR
	MSC-P5	IgG-Rezeptoren vorhanden? Durch IL-4 stimulierbar?	Fluoroskan II
	MSC-P5	Galectin-3 an der IgE-Bindung beteiligt ?	TNF α -DuoSet
3.5.2	Passive Sensibilisierung mit Mäuseplasma		
	Bestimmung geeigneter Parameter zur Beurteilung der passiven Sensibilisierung		
	MSC-P5	Vitalität von Keratinozyten nach TDI-Behandlung	CellTiter©
	MSC-P5	Anstieg von NO ohne Vorinkubation mit IL-4	Griess-Test
	MSC-P5	Anstieg von NO nach Vorinkubation mit IL-4	Griess-Test
	MSC-P5	Anstieg von TNF α ohne Vorinkubation mit IL-4	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Anstieg von TNF α nach Vorinkubation mit IL-4	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Anstieg von TNF α nach Vorinkubation mit IL-4	RT-PCR
	MSC-P5	Intrazellulärer Anstieg von TNF α	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Anstieg von IL-1 β nach Vorinkubation mit IL-4	IL-1 β -ELISA
	MSC-P5	Anstieg von IL-10 nach Vorinkubation mit IL-4	IL-10-ELISA
3.5.3	Zeitabhängigkeit der Plasmagewinnung auf die passive Sensibilisierung		
	MSC-P5	Vitalität von Keratinozyten nach Behandlung mit Mäuseplasma	CellTiter©
	MSC-P5	Nachweis von TNF α	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Nachweis von IL-1 β	IL-1 β -ELISA
3.5.4	Zeitabhängigkeit der Zytokinfreisetzung		
	MSC-P5	Zeitabhängigkeit TNF α -Freisetzung	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Zeitabhängigkeit IL-1 β -Freisetzung	IL-1 β -ELISA
	MSC-P5	Zeitabhängigkeit IL-10-Freisetzung	IL-10-ELISA
3.5.5	Passive Sensibilisierung mit reinem IgE		
	MSC-P5	Testen der geeigneten IgE-Verdünnung	TNF α -DuoSet
	MSC-P5	Testen der geeigneten DNP-BSA-Konzentration	TNF α -DuoSet
3.5.6	Interaktion Keratinozyt-Endothelzelle		
	Bend.3	Proliferationsänderung der Endothelzellen	BrdU
	Bend.3	Expression von VCAM-1	Fluoroskan II

3.5 Zellkulturversuche zur passiven Sensibilisierung

In den folgenden Kapiteln werden Versuche zur passiven Sensibilisierung beschrieben.

3.5.1 Nachweis der Immunglobulin-bindenden Rezeptoren auf MSC-P5-Zellen

Da die Existenz immunglobulinbindender Rezeptoren die Grundvoraussetzung für die passive Sensibilisierung darstellt, sollte zunächst diese Rezeptoren für MSC-P5-Zellen nachgewiesen werden.

3.5.1.1 Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten mittels Fluoroskan II
Für diesen Nachweis mußten die Zellen nicht von den Zellkulturplatten abgelöst werden, jedoch war hier kein Einzelzellnachweis möglich.

Die MSC-P5-Zellen wurden in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² in eine speziell für fluoreszenzmarkierte Antikörper geeignete 96-well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt und IL-4-haltiges Medium hinzugefügt. Die eingesetzten IL-4-Konzentrationen betragen: 0 / 15,6 / 31,25 / 62,5 / 125 / 250 / 500 und 750 ng/ml in serumfreiem RPMI 1640-Kulturmedium. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Anschließend wurde das Medium entfernt und die freien Bindungsstellen mit Blockierungslösung (200 µl/Kavität) gesättigt. Nach einer Stunde wurde die Kulturplatte mit der Waschlösung (200 µl/Kavität) gewaschen und 100 µl/Kavität der FcεRII-Antikörperlösung (1:100 mit PBS verdünnt) hinzugefügt. Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung, wurde anstelle des FcεRII-Antikörpers die IgG-Isotypkontrolle verwendet. Die Inkubationszeit des Antikörpers betrug 90 Minuten. Anschließend wurde die Kulturplatte dreimal mit 200 µl/Kavität Waschlösung gewaschen. Das Fluoreszenzsignal wurde im Fluoroskan II ermittelt. Die Anregungswellenlänge betrug 494 nm und die Detektionswellenlänge 517 nm. Als Kontrolle diente das Fluoreszenzsignal der Isotypkontrolle, dem in der Auswertung der Wert 100 % zugeordnet wurde. Die übrigen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen.

3.5.1.2 Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten mit Durchflußzytometrie

Für die Durchflußzytometrie mußten die Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst werden. Durch die Verwendung von enzymatischen Trennmitteln besteht die Gefahr, dass die Oberflächenproteine von den Zellen abgespalten werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem unter 3.4.1.1 beschriebenen Nachweisverfahren besteht darin, dass einzelne Zellen gemessen werden. Außerdem ist eine Unterscheidung von vitalen und abgestorbenen Zellen möglich.

Die MSC-P5-Zellen wurden in 25 cm²-Kulturflaschen in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat erfolgte die Behandlung der Zellen mit IL-4 in den Konzentrationen 0 / 15,625 / 31,25 / 62,5 / 125 / 250 / 500 und 750 ng/ml RPMI 1640. Nach 48 Stunden erfolgte der Nachweis des Rezeptors mit dem Durchflußzytometer. Für die Messung mußten die Zellen von der Kulturoberfläche abgelöst werden. Es wurden mehrere Trennmittel hinsichtlich ihrer Trenneigenschaften und Auswirkungen auf Oberflächenrezeptoren verglichen:

- mit Trypsin/EDTA: Das alte Medium wurde aus den Flaschen entfernt. Die Zellen wurden mit 2 ml EDTA 1 % gewaschen. Die Lösung wurde abgesaugt und 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 / 0,02 %) wurden in die Flaschen pipettiert. Die Inkubationsdauer betrug 5 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 5 ml RPMI 1640 (mit 10 % FKS) wurde das Trypsin inhibiert.
- mit EDTA: Das alte Medium wurde abgesaugt und 1,5 ml EDTA (1 %) in die Flaschen pipettiert. Die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten bei 37 °C.
- mit einem Schaber: Das alte Medium wurde abgesaugt und 1,5 ml PBS-Puffer zu den Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Flaschenoberfläche abgelöst.
- mit Accutase: Das alte Medium wurde abgesaugt und 1,5 ml Accutase-Lösung in die Flaschen pipettiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten konnten die Zellen abgelöst werden.

Die Zellsuspension wurde bei 1000 g und 4 °C über 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml serumfreien RPMI 1640-Medium resuspendiert. Bis zur Durchführung der Messung wurden die Zellen bei 4 °C gelagert. Um isolierte Zellen

von zusammenhängendem Zellaggregaten zu trennen, wurde die Zellsuspension durch eine Nylon-Membran filtriert.

Während der Durchführung wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 200000 Zellen/Kavität in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde fünf Minuten bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl MIF-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Antikörperlösung. Der Rat anti mouse CD23:FITC Antikörper wurde 1:25 mit PBS-Puffer verdünnt. Die IgG2a-Isotypkontrolle wurde unverdünnt verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Anschließend wurde die Platte 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der nachfolgende Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Die Zellen wurden in 100 µl MIF-Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl MIF-Puffer resuspendiert und in Reagenzröhrchen für die Durchflußzytometrie überführt. Zu den Zellsuspensionen wurden jeweils 200 µl Propidiumiodid-Lösung (2 µg/ml MIF-Puffer) hinzugefügt.

Bei der Ablösung mit Trypsin/EDTA lag der Anteil der vitalen Zellen zwischen 80 und 90 %. Außerdem lagen die Zellen überwiegend als Einzelzellen vor. Die Ablösung der Zellen mit EDTA ergab einen hohen Anteil von zusammenhängenden Zellverbänden, die bei der Filtration durch die Membran zurückgehalten wurden. Außerdem war der Anteil der vitalen Zellen wesentlich geringer als bei der Trypsin/EDTA-Ablösung. Das Abschaben der Zellen mit dem Zellschaber ergab nur wenige isolierte und vitale Zellen. Verwendung von Accutase zur Ablösung der Zellen ergab vergleichbare Trennergebnisse wie die Verwendung von Trypsin/EDTA. Auch hier lag die Vitalitätsrate der Zellen zwischen 80 % und 90 %.

3.5.1.2.1 Einfluß von Trypsin/EDTA und Accutase auf den durchflußzytometrischen Nachweis von FcεRII

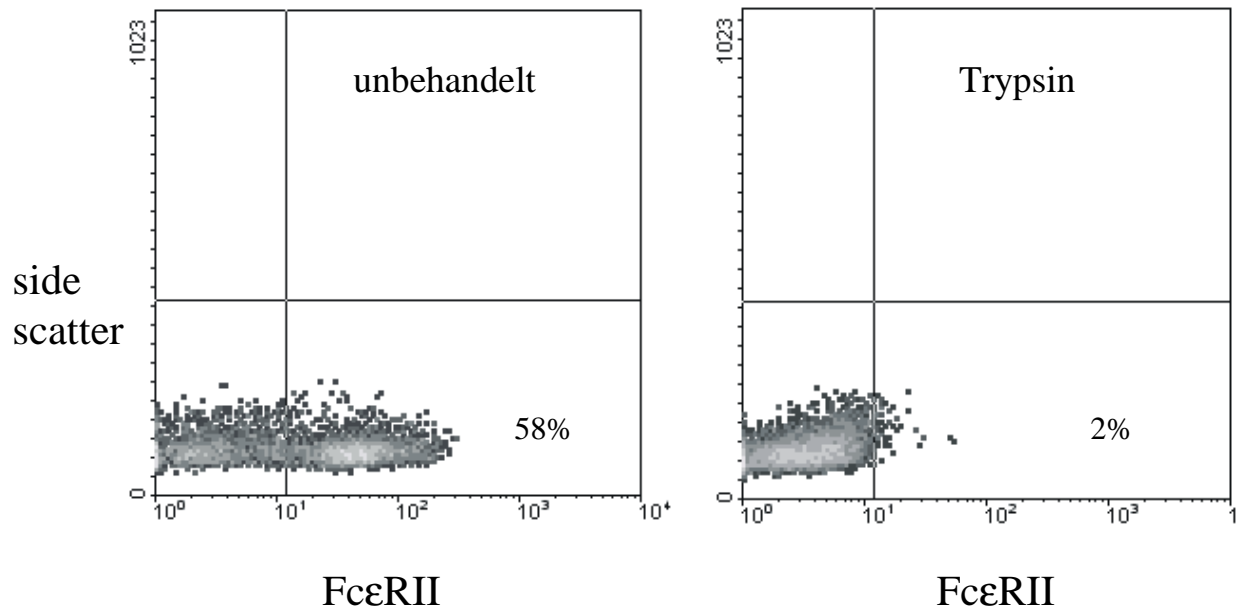


Abbildung 12: Durchflußzytometrischer FcεRII-Nachweis auf unbehandelten und mit Trypsin behandelten Milzzellen. Angabe des Fluoreszenzsignals von 10000 Zellen pro Nachweis. In dem unteren rechten Feld befinden sich die FcεRII-positiven Zellen.

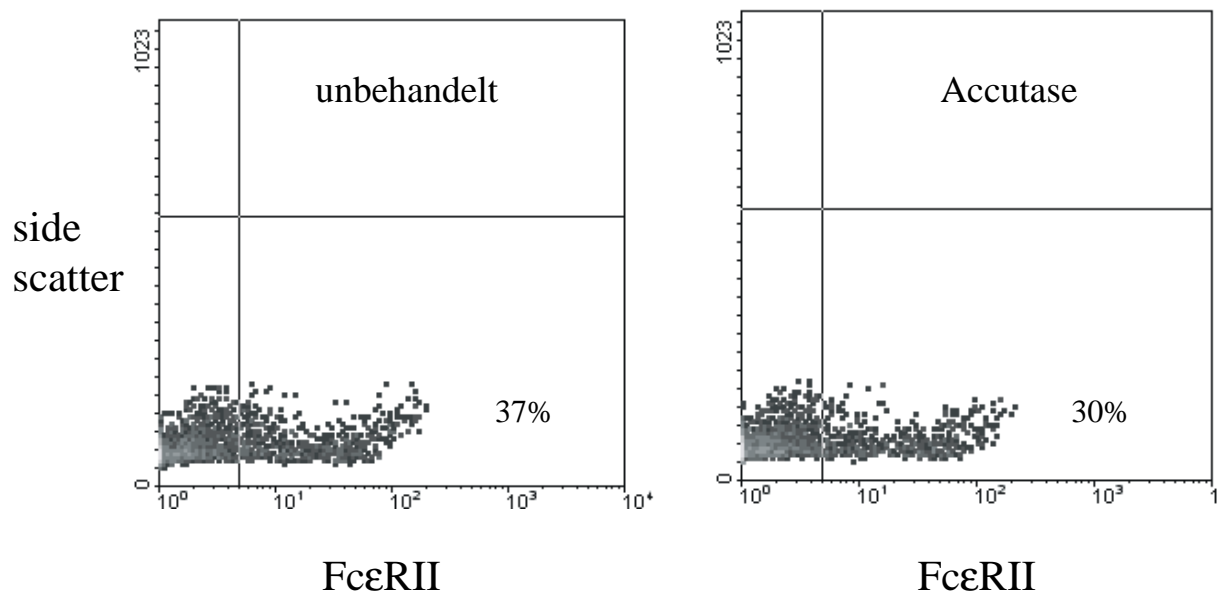


Abbildung 13: Durchflußzytometrischer FcεRII-Nachweis auf unbehandelten und mit Accutase behandelten Milzzellen. Angabe des Fluoreszenzsignals von 10000 Zellen pro Nachweis. In dem unteren rechten Feld befinden sich die FcεRII-positiven Zellen.

Wurden die Zellen 5 Minuten mit Trypsin behandelt, dann konnte kein FcεRII mehr auf den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 12). Durch die Verwendung von Accutase als alternatives Trennmittel zu Trypsin war das Fluoreszenzsignal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kaum verändert (Abb. 13).

Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurden die Keratinozyten mit Accutase anstelle von Trypsin von den Kunststoffoberflächen abgelöst, wenn FcεRII durchflußzytometrisch bestimmt werden sollte.

3.5.1.3 Indirekter Nachweis der IgE-Bindung von Keratinozyten über IgE-bindende Proteine (Galektin-3)

Aus der Literatur ist bekannt, dass Keratinozyten das IgE-bindende Protein Galektin-3 bilden (WOLLENBERG et al., 1993). In dem im folgenden beschriebenen Versuch sollte die Bindung von IgE an Keratinozyten über Galektin-3 nachgewiesen werden. Sowohl Laktose als auch IgE binden an Galektin-3. Die simultane Behandlung von MSC-P5-Zellen mit IgE und Laktose sollte die Bindung des Immunglobulins an Keratinozyten kompetitiv hemmen und die passive Sensibilisierung unterbinden.

MSC-P5-Zellen wurden in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² in einer Mikrotiterzellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Keratinozyten (vgl. 3.4.2) mit Mäuseplasma über 18 Stunden passiv sensibilisiert. Zeitgleich wurde Laktose in den Konzentrationen 0 / 0,0001 / 0,001 / 0,01 / 0,1 / 1,0 und 10,0 mmol/l hinzugefügt. 48 Stunden nach Zugabe des Antigens TDI wurde in den Zellkulturüberständen TNFα nachgewiesen. Um einen zytotoxischen Effekt ausschließen zu können, wurde mit den MSC-P5-Zellen zusätzlich ein Vitalitätstest (vgl. 3.2.3) durchgeführt.

3.5.1.4 Nachweis der IgG-Bindung von Keratinozyten mit dem Fluoroskan II

MSC-P5-Zellen wurden in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² in eine speziell für fluoreszenzmarkierte Antikörper geeignete 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit IL-4 in den Konzentrationen: 0, 10, 50 und 100

ng/ml über einen Zeitraum von 48 Stunden. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und IgG hinzugefügt. Entweder wurde das Immunglobulin als reiner Antikörper (100 µl Konzentrat/10 ml RPMI 1640) oder als Immunkomplex zugefügt. Der Immunkomplex wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Digoxin (Dig.) zur IgG-Lösung gebildet. Die Zellen wurden über 18 Stunden mit der reinen IgG-Lösung bzw. mit der Dig-IgG-Immunkomplexlösung inkubiert. In einem weiteren Versuch wurde anstelle des reinen IgG1 sensibilisiertes Mäuseplasma verwendet. Zum einen sollte IgG im Plasma von TDI-sensibilisierten Mäusen nachgewiesen werden. Zum anderen sollten auch niedrig affine IgG-Rezeptoren auf Keratinozyten nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde Blockierungslösung (200 µl/Kavität) zugefügt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des IgG-Antikörpers wurden Zellen nicht mit IgG behandelt. Nach 30 Minuten wurde die Platte dreimal mit der Waschlösung gewaschen und 100 µl anti-IgG-Antikörperlösung/Kavität pipettiert. Die Zellen wurden 30 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert. Der nichtgebundene Antikörper wurde entfernt und die Platte mit der Waschlösung dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt.

3.5.2 Passive Sensibilisierung muriner Keratinozyten

Murine Keratinozyten (MSC-P5) wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (MTP) in einer Dichte von 200000 Zellen/ml RPMI 1640-Medium (10 % FKS) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium abgesaugt und 100 µl IL-4 Lösung (100 ng/ml RPMI 1640) über einen Zeitraum von 48 Stunden hinzugefügt.

Nach 72 Stunden erfolgte die passive Sensibilisierung der Keratinozyten. Dazu wurde die IL-4-Lösung abgesaugt und 100 µl Plasmalösung hinzupipettiert. Das Plasma wurde 1:10 mit RPMI 1640 Medium verdünnt. Die nicht sensibilisierten Kontrollgruppen erhielten Mäuseplasma von Tieren, die nicht gegenüber TDI sensibilisiert waren. Nach 18 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Plasmalösung abgesaugt und 100 µl TDI-Lösung (100 µg/ml RPMI 1640)/Kavität hinzugefügt wurden. Die Kontrollgruppen erhielten nur RPMI 1640-Kulturmedium ohne Zusatz von TDI. Die allergische Reaktion der Zellen konnte mit der Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im Griess-Test oder mit der Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-10 im ELISA ermittelt werden. Der Griess-Test wurde direkt in der Kulturplatte durchgeführt, während die Zytokine im Kulturüberstand bestimmt wurden. Bis zur Bestimmung wurden die Überstände bei -80°C eingefroren. Ein Vitalitätstest (vgl. 3.2.3) schloß zytotoxische Effekte aus.

3.5.3 Bestimmung der Abhängigkeit des Zeitpunktes der Entnahme des Plasmas sensibilisierter Tiere auf die Freisetzung von TNF α und IL-1 β

Das eingesetzte Mäuseplasma wurde zu vorher festgelegten Zeitpunkten nach der Antigenbehandlung der Mäuse gewonnen. Die Zeitpunkte der Plasmagewinnung waren: 0,3 / 2 / 7 / 14 und 21 Tage nach der Behandlung der Mäuse mit TDI.

Nach der Behandlung der Keratinozyten mit IL-4 erfolgte die Sensibilisierung mit dem entsprechenden Plasma. Als Kontrollgruppe wurde Plasma von nicht sensibilisierten Tieren verwendet. Nach 18 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit TDI. Zur Bestimmung der Reaktion der Zellen wurden IL-1 β und TNF α gemessen. Um zytotoxische Reaktionen der Zellen auszuschließen, wurde gleichzeitig die Vitalität der Zellen bestimmt.

3.5.4 Bestimmung von TNF α , IL-1 β und IL-10 an verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung der Keratinozyten mit TDI

Die MSC-P5-Zellen wurden mit IL-4 (100 ng/ml RPMI 1640) stimuliert. Anschließend erfolgte die Sensibilisierung der Keratinozyten mit Mäuseplasma, das sieben Tage nach der TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Antigen TDI. Nach 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden erfolgte die Probenahme. Zur Bestimmung der Reaktion der Zellen wurden die Zytokine IL-10, IL-1 β und TNF α im Kulturüberstand bestimmt.

3.5.5 Passive Sensibilisierung mit reinem IgE

Um die Sensibilisierung unter standardisierteren Voraussetzungen durchführen zu können, wurde reines IgE anstelle des Mäuseplasmas verwendet.

3.5.5.1 Ermittlung der geeigneten IgE-Verdünnung als Nachweis für die Freisetzung von TNF α als Reaktion der MSC-P5-Zellen auf die passive Sensibilisierung

MSC-P5-Zellen wurden in einer Konzentration von 80000 Zellen/cm² in eine 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen mit IL-4 (100 ng/ml). Je 100 μ l der IL-4-Gebrauchslösung wurden pro Kavität pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Anschließend wurde den Zellen eine anti-DNP-IgE-Lösung zugefügt. Die eingesetzten IgE-Konzentrationen waren: 20, 30, 50 und 100 μ l/10 ml serumfreies RPMI 1640-Medium. Die Zellen wurden 16 Stunden mit der jeweiligen Lösung inkubiert. Die DNP-BSA Gebrauchslösung (10 μ g/ml RPMI 1640 (serumfrei)) wurde den Zellen nach 16 Stunden zugefügt. Nach 48 Stunden wurden die Überstände gesammelt und bis zur TNF α -Bestimmung bei -80°C gelagert.

3.5.5.2 Ermittlung der geeigneten DNP-BSA-Verdünnung als Nachweis für die Freisetzung von TNF α als Reaktion der MSC-P5-Zellen auf die passive Sensibilisierung.

Die MSC-P5-Zellen wurden in gleicher Weise wie in dem vorher beschriebenen Versuch behandelt. Als eingesetzte anti-DNP-IgE-Konzentration für alle Zellen wurde eine Verdünnung von 100 μ l/10 ml RPMI 1640 verwandt. Nach 16 Stunden erfolgte die Inkubation mit verschiedenen DNP-BSA-Konzentrationen. Die eingesetzten Konzentrationen waren:

0, 10, 30, 100, 300 und 1000 µg DNP-BSA/ml RPMI 1640. Nach 48 Stunden wurden die Überstände gesammelt und bis zur TNF α -Bestimmung bei -80°C gelagert.

3.5.6 Nachweis der Interaktion von Keratinozyten und Endothelzellen

Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen. Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen wandern aus den Blutgefäßen in das Gewebe, um dort das Antigen zu eliminieren. Um das Endothel zu durchdringen, müssen diese Zellen an Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen binden (z.B. VCAM-1). Außerdem steigert sich die Proliferationsaktivität von Endothelzellen während immunologischer Abwehrreaktionen. Um die Rolle von Keratinozyten bei immunologisch bedingten Abwehrreaktionen der Haut zu untersuchen, sollte die Interaktion zwischen Keratinozyt und Endothelzelle nachgewiesen werden.

Für diesen Versuch wurden bend.3-Zellen mit Überstand von sensibilisierten MSC-P5-Zellen behandelt.

Die Endothelzellen wurden in einer Dichte von 80000 Zellen/cm² in eine 96-well-Kulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Überstand von Keratinozyten, die passiv sensibilisiert wurden. Zur Bestimmung der Proliferation wurden die Endothelzellen über 48 Stunden mit dem Kulturüberstand behandelt. Um die Induktion von VCAM-1 zu untersuchen, betrug die Inkubationszeit acht Stunden. Die Proliferation wurde durch den Einbau von BrdU (vgl. 3.3.4) bestimmt. VCAM-1 wurde mit einem FITC-markierten Antikörper nachgewiesen .

3.5.6.1 Nachweis von Adhäsionsmolekülen auf der Membran von bend.3-Zellen

Die Zellen wurden in einer speziell für fluoreszenzmarkierte Antikörper geeignete 96-well-Kulturplatte ausgesät. Nach der Behandlung der Zellen mit Überstand von passiv sensibilisierten Zellen sollte VCAM-1 auf den Endothelzellen nachgewiesen werden. Das Medium wurde abgesaugt und Blockierungsreagenz (200 µl/Kavität) hinzugefügt. Nach 30 Minuten wurde die Blockierungslösung entfernt und die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde der VCAM-1-Antikörper (100 µl/Kavität) hinzugefügt. Der Antikörper wurde 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt. Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung, wurde anstelle des VCAM-1-Antikörpers die IgG-Isotypkontrolle verwendet. Nach 30 Minuten wurde der nicht gebundene Antikörper entfernt und die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen. Danach wurden 100 µl PBS/Kavität hinzugefügt und das Fluoreszenzsignal bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 494 nm und die Detektionswellenlänge 517 nm. Als Kontrolle diente das Fluoreszenzsignal der Isotypkontrolle, der in der Auswertung der Wert 100% zugeordnet wurde. Die übrigen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen.

4 ERGEBNISSE

Damit Keratinozyten Immunglobuline binden können, müssen Fc-Rezeptoren auf der Zellmembran vorhanden sein. Dazu wurde zunächst die Existenz der Fc ϵ - und Fc γ -Rezeptoren auf Keratinozyten untersucht. Um die Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung zu prüfen, wurde die Freisetzung von Stickstoffmonoxid als Parameter festgelegt. Zunächst wurde dazu die Fähigkeit der MSC-P5-Zellen zur Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid bestätigt. Danach wurden die Zellen durch die Behandlung mit Mäuseplasma sensibilisiert und das spezifische Antigen hinzugefügt. Als Meßparameter der passiven Sensibilisierung wurden zunächst die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und TNF α untersucht. Um die TNF α -Messung mit einer weiteren Bestimmung abzusichern, wurde zusätzlich die mRNA für TNF α in der RT-PCR nachgewiesen. Anschließend wurden IL-1 β und IL-10 als zusätzliche Zytokine im Überstand passiv sensibilisierter Zellen bestimmt. In einigen Versuchen waren die gemessenen Zytokinwerte von Keratinozyten, die nur mit Mäuseplasma aber nicht mit TDI behandelt wurden, genauso groß wie die von zusätzlich TDI-behandelten Zellen. Da in diesen Versuchen nur der Zeitpunkt der Plasmagewinnung variierte, sollte die Abhängigkeit der passiven Sensibilisierung von der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung der Mäuse und Plasmagewinnung untersucht werden. Nachdem der ideale Zeitpunkt der Plasmagewinnung festgelegt war, wurde die Freisetzung der Mediatoren in Abhängigkeit der Zeit nach der TDI-Behandlung der Zellen untersucht. Die Interaktion zwischen Keratinozyten und Endothelzellen sollte einen Hinweis auf die Bedeutung von Keratinozyten in immunologischen Abwehrreaktionen der Haut geben. Dazu wurde der Einfluß von Mediatoren, die von passiv sensibilisierten Keratinozyten freigesetzt wurden, auf Endothelzellen untersucht. Untersuchungsparameter waren die Proliferationsaktivität der Endothelzellen und die Expression von VCAM-1. Neben der Verwendung von Mäuseplasma sollten zusätzlich reines IgE zur passiven Sensibilisierung standardisierte Bedingungen geschaffen werden.

4.1 Nachweis Immunglobulinbindender Rezeptoren auf MSC-P5-Zellen

Die Bindung von Immunglobulinen ist die wichtigste Voraussetzung für eine Sensibilisierung von Keratinozyten. Damit Keratinozyten überhaupt Immunglobuline binden können, müssen an ihrer Membran Fc-Rezeptoren vorhanden sein.

4.1.1 Nachweis von FcεRII auf der Oberfläche von Keratinozyten

Der niedrig affine Rezeptor für IgE ist FcεRII (CD23). Nach BÈCHEREL et al. (1996) bewirkt IL-4 eine gesteigerte Ausbildung dieses Rezeptors auf der Oberfläche von Keratinozyten. Zusätzlich sollte auch der hoch affine IgE Rezeptor (FcεRI) nachgewiesen werden.

4.1.1.1 Nachweis von FcεRII mRNA

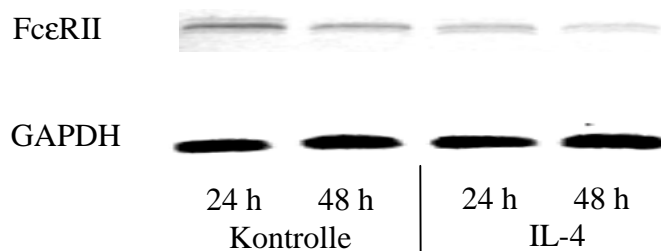


Abbildung 14: mRNA von FcεRII nachgewiesen mit RT-PCR. RNA isoliert aus Keratinozyten 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit IL-4. Der Kontrolle wurde IL-4-freies Medium zugefügt.

mRNA für FcεRII konnte in Keratinozytenproben unterschiedlich deutlich nachgewiesen werden. Eine Inkubation der Zellen mit IL-4 führte nicht zu einer vermehrten Bildung von mRNA (Abb. 14). Somit konnte eine stimulierende Wirkung von IL-4 auf die Translation von FcεRII unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

In den gleichen Proben konnte keine mRNA für FcεRI nachgewiesen werden.

4.1.1.2 Immunologischer Nachweis von FcεRII

Im Gegensatz zur durchflußzytometrischen Nachweismethode war keine Ablösung und Isolierung der Keratinozyten erforderlich. Durch diese Methode ist jedoch auch kein Einzelzellnachweis möglich.

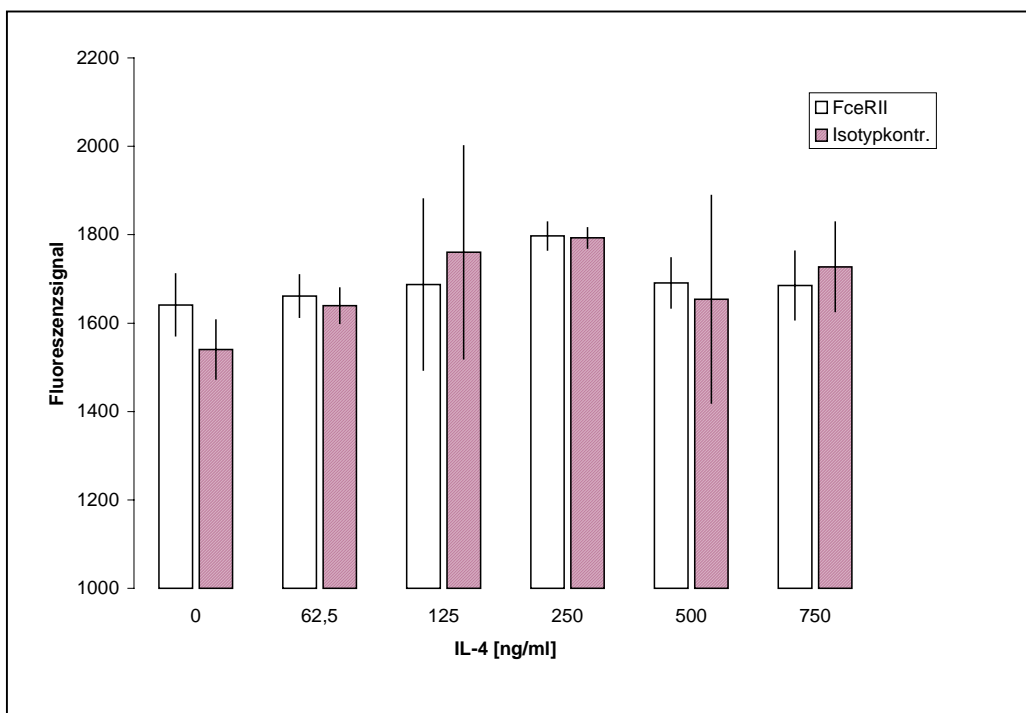


Abbildung 15: Nachweis von FcεRII mit FITC-markierten Antikörpern im Fluoroskan II. Einfluß von IL-4 auf die Expression von FcεRII. MSC-P5-Zellen wurden über 48 Stunden mit IL-4 behandelt. Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung aus sechs unterschiedlichen Versuchen.

Nach Behandlung der Zellen mit IL-4 konnte keine stärkere Bindung des FcεRII-spezifischen Antikörpers im Vergleich zur Isotypkontrolle nachgewiesen werden. Sowohl der IL-4-spezifische Antikörper als auch die Isotypkontrolle wurden am stärksten von Keratinozyten gebunden, die vorher mit 250 ng/ml IL-4 behandelt wurden (Abb. 15).

4.1.1.3 Durchflußzytometrischer Nachweis von FcεRII auf Keratinozyten

Zur Messung mußten die Zellen von den Kulturflaschen abgelöst werden. (vgl. 3.4.1.2).

Diese Methode ermöglicht einen Einzelzellnachweis.

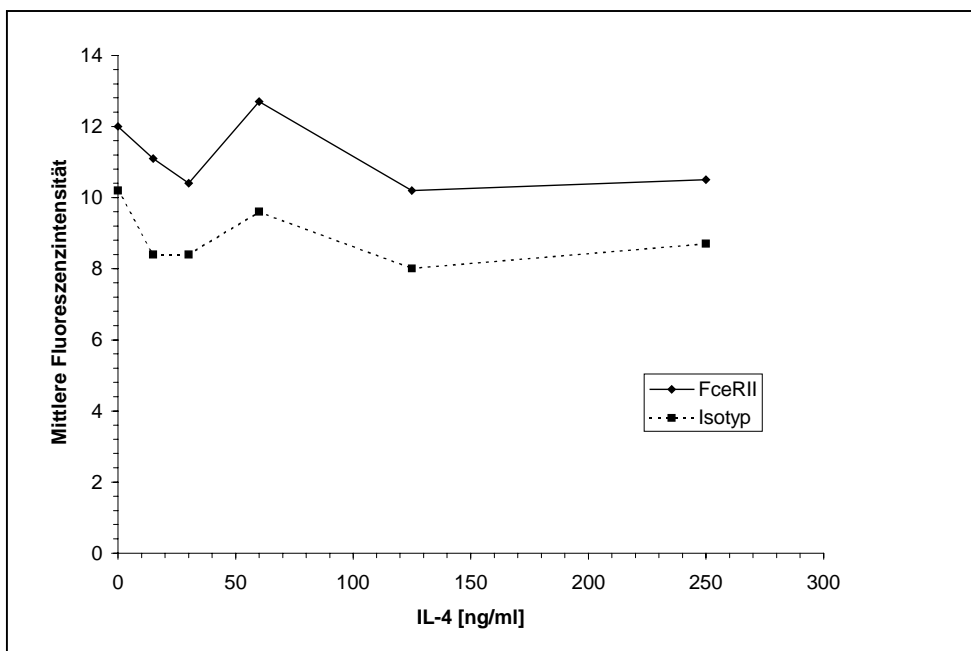


Abbildung 16: Durchflußzytometrischer Nachweis von FcεRII bei Keratinozyten nach Stimulation mit IL-4 über 48 Stunden. Mittlere Fluoreszenzintensität von 10000 Zellen pro Meßpunkt.

Die mittleren Fluoreszenzintensitäten des FcεRII-spezifischen Antikörpers lagen während der gesamten Messung jeweils über denen der Isotypkontrolle. Jedoch führte die Stimulation der MSC-P5-Zellen mit IL-4 nicht zur vermehrten Bindung des FcεRII-Antikörpers (Abb. 16). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche konstitutive Expression des niedrig affinen IgE-Rezeptors hin, der jedoch durch IL-4-Behandlung nicht vermehrt auf Keratinozyten nachzuweisen ist.

4.1.2 Fähigkeit der MSC-P5-Zellen zur Bindung von IgG

Um die Fähigkeit der MSC-P5-Zellen zur Bindung von IgG zu zeigen, wurden sowohl hoch affine als auch niedrig affine Rezeptoren für IgG nachgewiesen.

4.1.2.1 Bestimmung der Expression von Fc γ R1 bestimmt.

Der hoch-affine Rezeptor bindet nur freies IgG1.

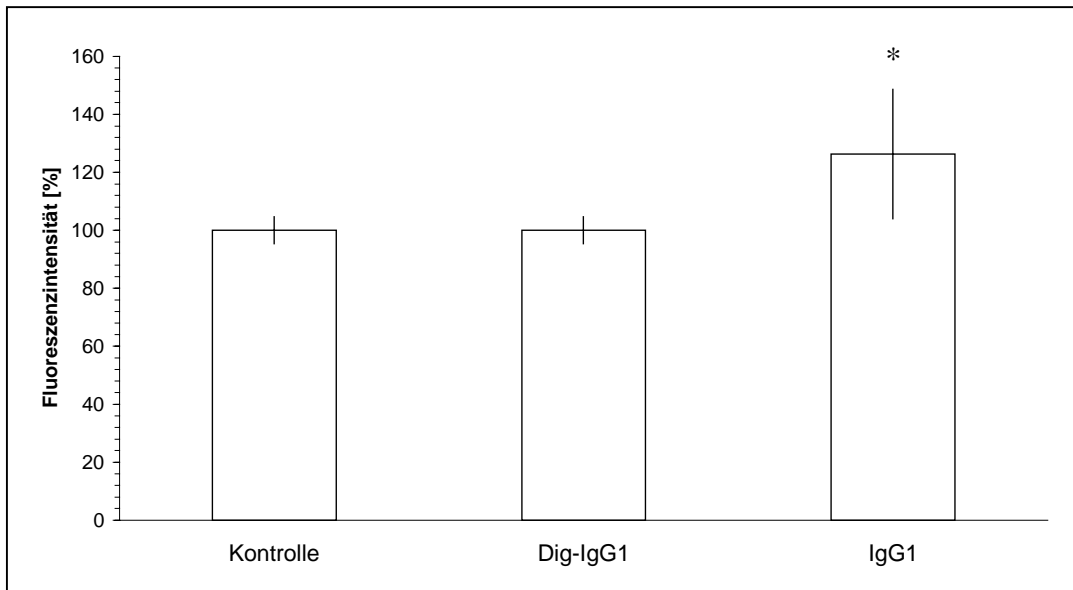


Abbildung 17: Prozentuale Bindung von IgG1 bzw. Antigen-IgG1-Komplex (Dig-IgG1) an Keratinozyten. Kontrolle = nicht IgG-behandelte Keratinozyten. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Kontrolle.

Zellen, die mit dem Digoxin-IgG1-Komplex behandelt wurden, zeigten keine höhere Affinität zu dem IgG-Antikörper als die nicht mit IgG behandelte Kontrolle. Dagegen zeigten mit IgG1 behandelte Keratinozyten eine um 26 % gesteigerte Affinität zu dem eingesetzten Antikörper (Abb. 17). MSC-P5-Zellen exprimieren hoch-affine Fc γ -Rezeptoren, die freies IgG1 binden können.

4.1.2.2 Nachweis niedrig affiner Fc γ -Rezeptoren von Keratinozyten

Mit der verwendeten Methode war eine genaue Identifizierung der Fc γ -Rezeptoren nicht möglich. Es besteht die Möglichkeit die Bindung von IgG an niedrig affine Rezeptoren zu zeigen.

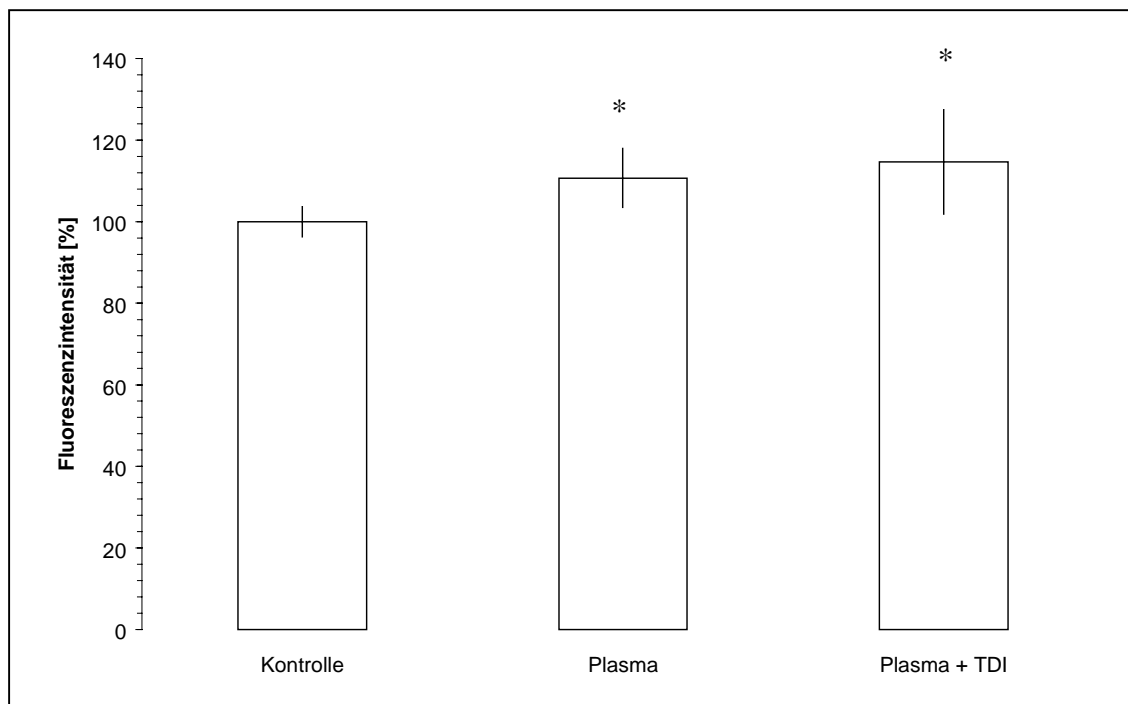


Abbildung 18: Bestimmung des gebundenen IgG aus Mäuseplasma an MSC-P5-Zellen. Keratinozyten entweder mit reinem Mäuseplasma oder TDI-Mäuseplasma-Immunkomplex behandelt. Als Kontrolle wurde die Bindung des IgG-Antikörpers an Keratinozyten ohne vorherige IgG-Inkubation verwendet. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Bindungsaffinität von IgG wurde mit einem FITC-markierten anti-mouse IgG-Antikörper bestimmt (Abb. 18). Die Bindung des Antikörpers an Keratinozyten, die nicht mit IgG inkubiert wurden, erhielt den Wert 100 % (Kontrolle). Bei Keratinozyten, die mit sensibilisiertem Mäuseplasma inkubiert wurden, kam es zu einer signifikant gesteigerten Bindung des IgG-Antikörpers (110 %). Eine Inkubation der MSC-P5-Zellen mit dem Immunkomplex aus TDI und Mäuseplasma führte ebenso zu einer signifikant erhöhten Bindung des Antikörpers (115 %). Dies deutet darauf hin, dass im Mäuseplasma neben IgG1 vor allem IgG2 und IgG3 enthalten sind, die als Immunkomplexe mit TDI an die Keratinozyten gebunden werden.

4.1.2.3 Expression des Fc γ -R1 nach Stimulation mit IL-4

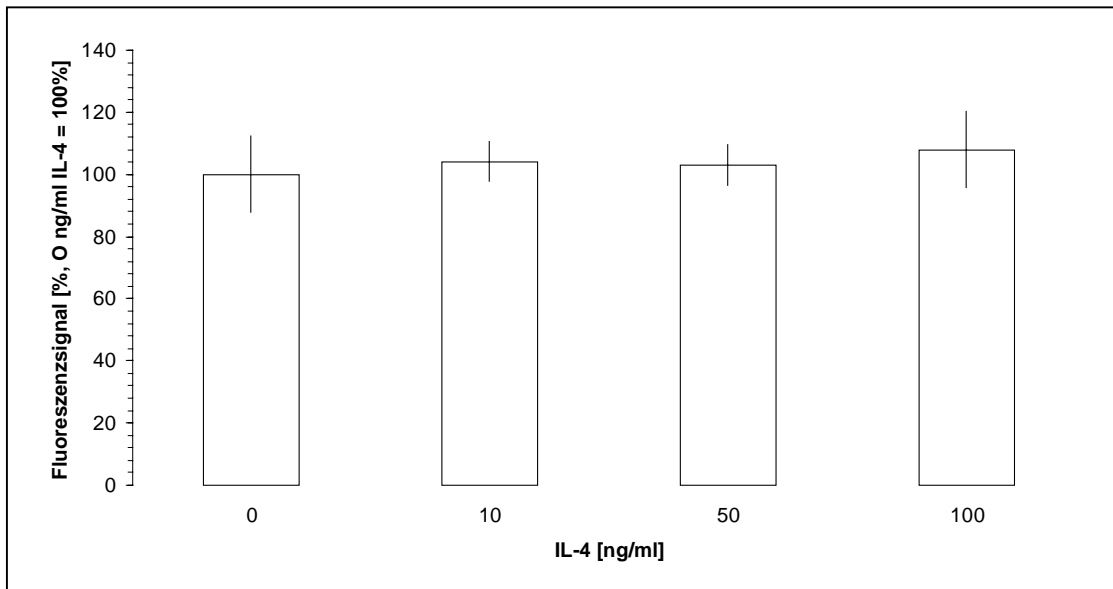


Abbildung 19: Einfluß von IL-4 auf die Bindung von IgG1 an Keratinozyten. Bestimmung des gebundenen IgG mittels FITC-markierter Antikörper mittels FluoroskanII. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Ansätzen.

Durch die Behandlung mit IL-4 konnte die Affinität der Keratinozyten gegenüber IgG1 nicht signifikant gesteigert werden (Abb. 19).

Weder der Rezeptor für IgE noch für IgG waren durch die Behandlung mit IL-4 stimulierbar. Auf den MSC-P5-Zellen waren die Rezeptoren jedoch konstitutiv vorhanden, so dass sich diese Zelllinie zur passiven Sensibilisierung eignete.

4.1.3 Indirekter Nachweis der Bindung von IgE an Keratinozyten über Galektin-3

Laktose wird wie IgE von Galektin-3 gebunden. Der Einfluß von Laktose auf die freigesetzte TNF α -Menge, die von passiv sensibilisierten und antigenbehandelten Keratinozyten sezerniert wird, gibt einen Hinweis auf die Beteiligung von Galektin-3 an der passiven Sensibilisierung.

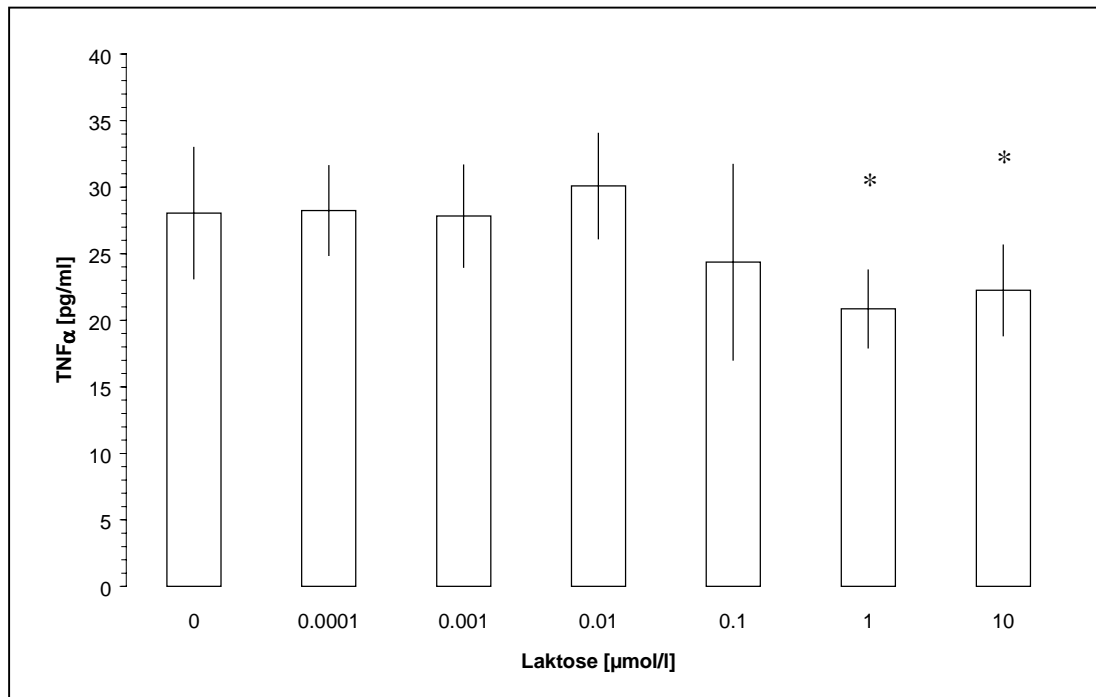


Abbildung 20: Freisetzung von TNF α nach passiver Sensibilisierung und Behandlung mit Laktose. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu 0 $\mu\text{mol/l}$ Laktose.

Die passiv sensibilisierten Keratinozyten, die zusätzlich mit TDI behandelt wurden, setzten $28 \pm 4,9$ pg/ml TNF α frei. Wurden die Zellen zeitgleich zu der Antigenbehandlung mit Laktose inkubiert, zeigte sich ab einer eingesetzten Laktosekonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ eine Reduktion der TNF α -Freisetzung. Eine eingesetzte Laktosekonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ führte zu einer Freisetzung von $24 \pm 7,3$ pg/ml TNF α . Wurde die Laktosekonzentration auf 1 bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ erhöht, reduzierte sich die freigesetzte TNF α -Menge auf $20,9 \pm 2,9$ bzw. $22,2 \pm 3,4$ pg/ml. Es scheint, dass ab einer Laktosekonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ die sezernierte TNF α -Menge zwischen 20 und 22 pg/ml stagniert (Abb. 20). Um eine zytotoxische

Wirkung von Laktose auszuschließen, wurden die gemessenen TNF α -Werte in Relation zur Vitalität der Zellen gesetzt.

4.2 Passive Sensibilisierung von MSC-P5-Zellen mit Mäuseplasma

Im folgenden werden die Ergebnisse der Versuche zur passiven Sensibilisierung von murinen Keratinozyten dargestellt. Im Fordergrund stand die Fragestellung welche Mediatoren von Keratinozyten als Reaktion auf die passive Sensibilisierung freigesetzt werden.

4.2.1 Wirkung von TDI auf die Vitalität der MSC-P5-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt auszuschließen, wurde zunächst die Auswirkung einer TDI-Behandlung auf die Vitalität der MSC-P5-Zellen bestimmt.

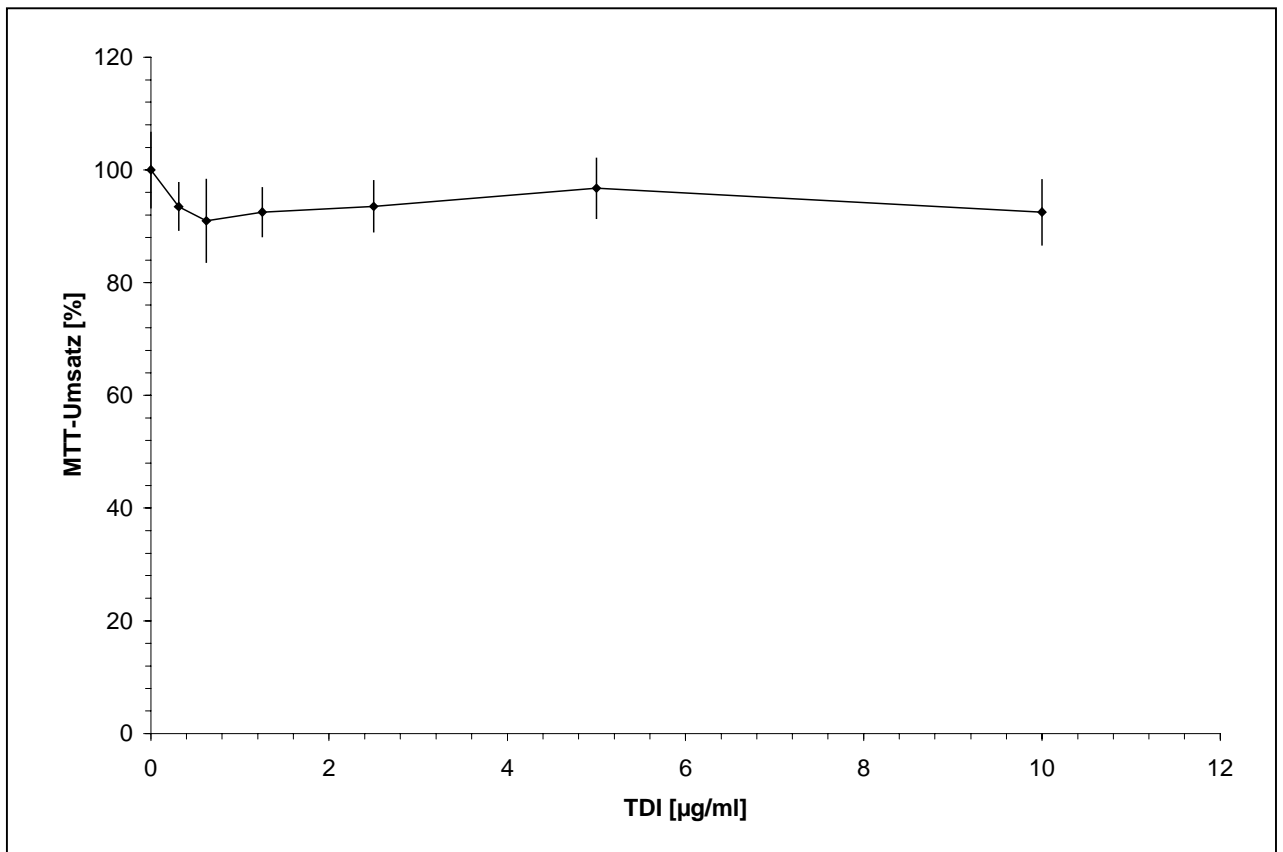


Abbildung 21: Vitalität von Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Mengen von TDI über 48 Stunden. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen.

Die eingesetzte TDI-Konzentration bis 10 µg/ml bewirkte keine signifikante Abnahme der Vitalität der MSC-P5-Zellen (Abb. 21). Für die nachfolgenden Versuche wurde eine TDI-Konzentration von 1 µg/ml verwendet.

4.2.2 Bestimmung geeigneter Parameter zum Nachweis der Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung

Im Gegensatz zu den Versuchen von Bècherel et al. (1991), in denen humane Keratinozyten durch Inkubation mit reinem IgE sensibilisiert wurden, sollten in eigenen Untersuchungen MSC-P5-Zellen durch Inkubation mit Mäuseplasma sensibilisiert werden. In dem sensibilisierten Mäuseplasma war neben IgE auch IgG enthalten, so dass dieser Ansatz eher der Situation der Keratinozyten im Organismus entsprach. Es sollten geeignete Parameter bestimmt werden, mit denen die Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung genau und reproduzierbar bestimmt werden kann. Außerdem sollte ein möglicher Einfluß einer vorangegangenen IL-4-Stimulation untersucht werden.

4.2.2.1 Nachweis von Stickstoffmonoxid (ohne vorherige Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

Der Nachweis von NO wurde mit dem Griess-Test durchgeführt. Dazu wurde die NO-Freisetzung von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung bestimmt. In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von NO ohne vorherige Simulation mit IL-4 angegeben.

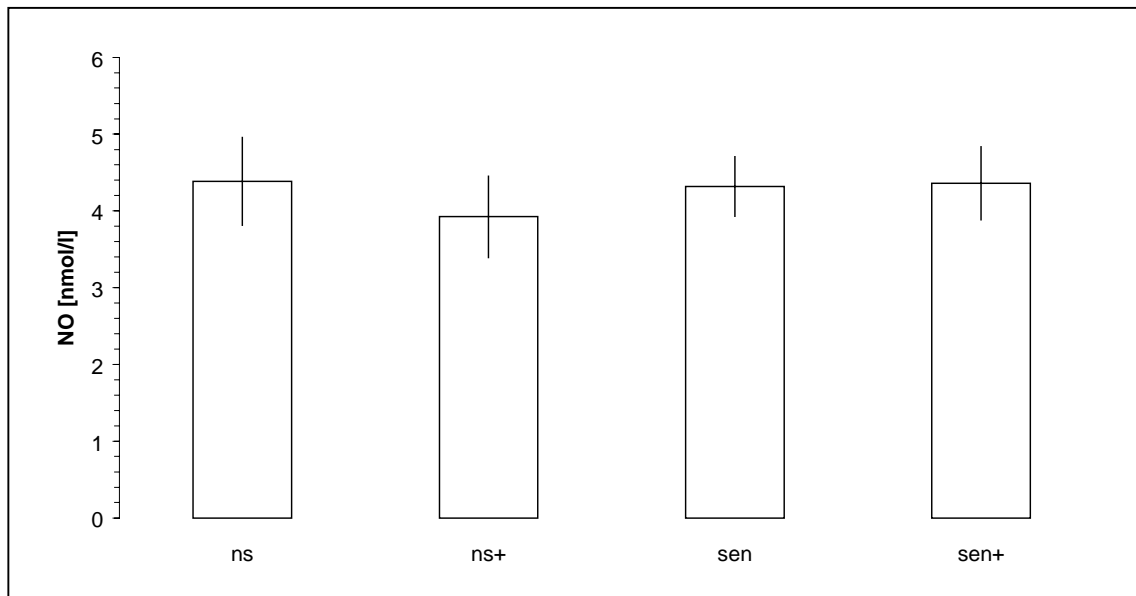


Abbildung 22: NO-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels Griess-Test. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unterschiedlichen Versuchen.

Durch die Behandlung der MSC-P5-Zellen mit TDI konnte keine gesteigerte NO-Freisetzung induziert werden (Abb. 22). Die nicht sensibilisierte Kontrollgruppe setzte eine NO-Menge von $4,4 \pm 0,57$ nmol/l frei. Durch Behandlung der nicht sensibilisierten Zellen mit dem Antigen TDI sank die freigesetzte NO-Menge auf $3,8 \pm 0,42$ nmol/l. Sowohl die alleinige Sensibilisierung der Keratinozyten mit Mäuseplasma als auch die zusätzliche Behandlung mit TDI ergaben eine freigesetzte NO-Menge von $4,2 \pm 0,25$ bzw. $4,3 \pm 0,48$ nmol/l.

4.2.2.2 Nachweis von Stickstoffmonoxid (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von NO nach vorheriger Stimulierung der Keratinozyten mit IL-4 zu sehen. Dieser Nachweis wurde mit dem Griess-Test durchgeführt.

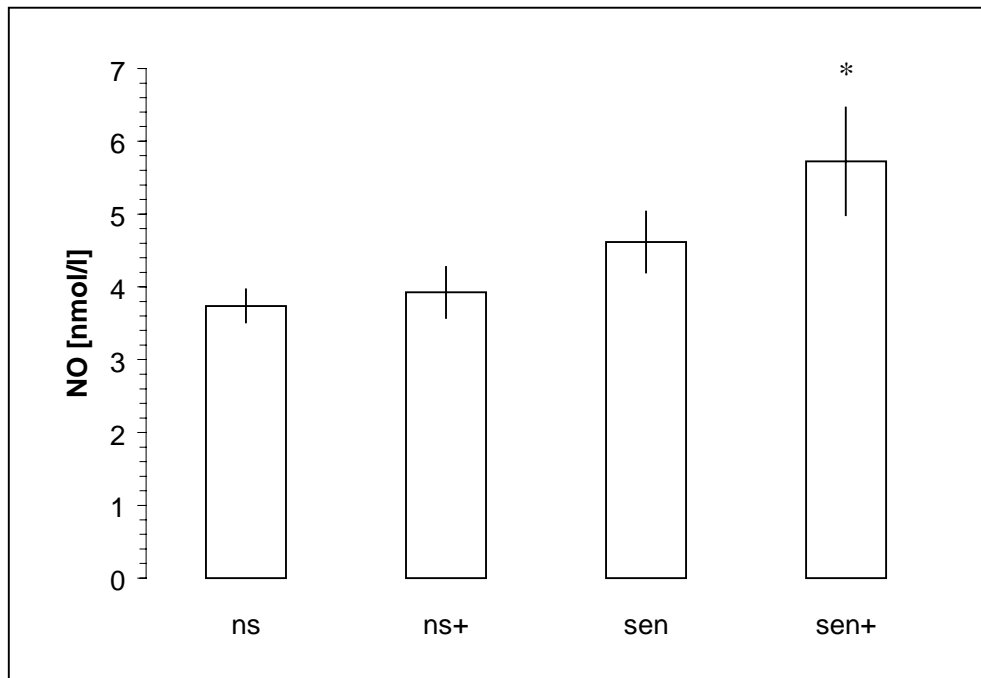


Abbildung 23: NO-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels Griess-Test. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu sen.

Die nicht sensibilisierte Kontrollgruppe setzte $3,7 \pm 0,23$ nmol/l NO frei. Durch Behandlung der nicht sensibilisierten Zellen mit dem Antigen TDI stieg die freigesetzte NO-Menge auf $3,9 \pm 0,35$ nmol/l. Die alleinige Sensibilisierung der Keratinozyten mit Mäuseplasma ergab eine freigesetzte NO-Menge von $4,6 \pm 0,42$ nmol/l. Einen deutlichen Anstieg der NO-Konzentration konnte in Zellkulturen gemessen werden, die sowohl passiv sensibilisiert als auch mit TDI behandelt wurden. Hier erreichte die gemessene NO-Konzentration einen Wert von $5,7 \pm 0,74$ nmol/l (Abb. 23).

4.2.2.3 Nachweis von TNF α (ohne vorherige Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

Der Nachweis von TNF α wurde mit dem TNF α -DuoSet durchgeführt. Dazu wurde die TNF α -Freisetzung von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung bestimmt. In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von TNF α ohne vorherige Simulation mit IL-4 angegeben.

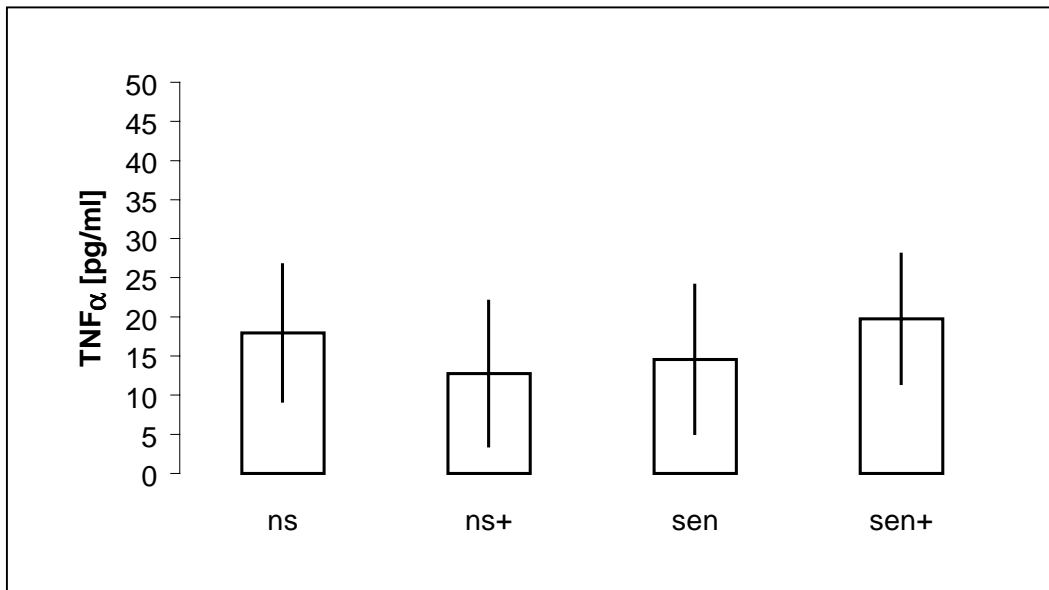


Abbildung 24: TNF α -Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mit TNF α -DuoSet. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unterschiedlichen Versuchen.

Es war keine gesteigerte TNF α -Freisetzung aus Keratinozyten nach TDI-Behandlung meßbar. In der nicht sensibilisierten Kontrollgruppe wurde eine TNF α -Konzentration von $18 \pm 8,7$ pg/ml gemessen. Die nicht sensibilisierten Keratinozyten, die nur mit dem Antigen behandelt wurden, setzten $13 \pm 9,2$ pg/ml TNF α frei. Die Zugabe des sensibilisierten Mäuseplasmas führte zu einer Freisetzung von $15 \pm 9,5$ pg/ml TNF α . Wurde zusätzlich noch TDI gegeben, dann erhöhte sich die Menge an freigesetztem TNF α auf $20 \pm 8,3$ pg/ml (Abb. 24).

4.2.2.4 Nachweis von TNF α (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von TNF α nach vorheriger Stimulierung der Keratinozyten mit IL-4 zu sehen. Dieser Nachweis wurde mit dem TNF α -DuoSet durchgeführt.

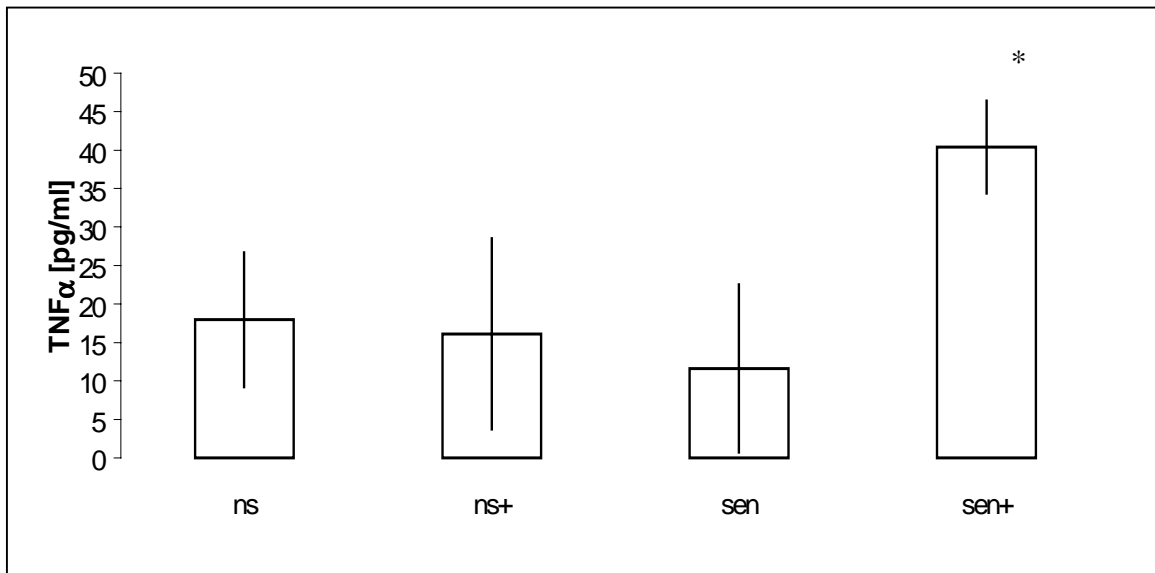


Abbildung 25: TNF α -Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mit TNF α DuoSet. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns.

Alle Zellen wurden vor der Zugabe des Mäuseplasmas mit 100 pg/ml IL-4 über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt.

In der nicht sensibilisierten Kontrollgruppe wurde eine TNF α -Konzentration von $18 \pm 8,7$ pg/ml gemessen. Die Behandlung der nicht sensibilisierten Zellen mit TDI bewirkte eine Freisetzung von $16 \pm 12,4$ pg/ml TNF α . Die mit sensibilisiertem Mäuseplasma behandelten Zellen setzten eine TNF α -Menge von $12 \pm 10,9$ pg/ml frei. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Antigen TDI zeigte einen deutlichen Anstieg der TNF α -Konzentration im Zellkulturüberstand. Die gemessene Konzentration betrug $40 \pm 5,9$ pg/ml (Abb. 25).

Auch wenn eine Inkubation der MSC-P5-Zellen mit IL-4 die Expression der immunglobulin-bindenden Rezeptoren nicht beeinflusst, so wird die Freisetzung von NO und TNF α aus sensibilisierten und mit Antigen behandelten Zellen gesteigert. Als Konsequenz wurden in den nachfolgenden Versuchen die MSC-P5-Zellen immer mit 100 ng/ml IL-4 über 48 Stunden vorbehandelt.

4.2.2.5 Nachweis von TNF α -mRNA

Der vorher gemessene Anstieg der TNF α -Konzentration im Überstand von passiv sensibilisierten Keatinozyten, die zusätzlich mit dem Antigen TDI behandelt wurden, wurde durch den Nachweis der mRNA für TNF α bestätigt und abgesichert.

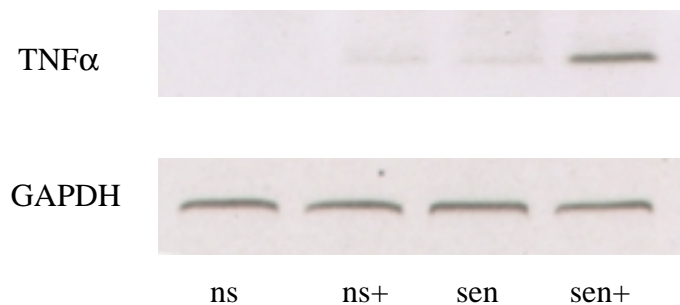


Abbildung 26: mRNA von TNF α und GAPDH nachgewiesen mit RT-PCR. RNA isoliert aus Keratinozyten vier Stunden nach passiver Sensibilisierung. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI.

Die in der RT-PCR eingesetzte RNA wurde vier Stunden nach der Gabe des Antigens aus den Keratinozyten isoliert. Mit Hilfe des Nachweises der mRNA für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurden die mRNA-Konzentrationen der einzelnen Proben einheitlich eingestellt. In nicht sensibilisierten Keratinozyten (ns) war keine mRNA für TNF α nachweisbar. Wurden die Zellen mit TDI inkubiert (ns+), konnte eine schwache Bande für TNF α nachgewiesen werden. Waren die Zellen durch die Zugabe von sensibilisiertem Mäuseplasma passiv stimuliert (sen), war ebenfalls nur eine schwache Bande für TNF α sichtbar. Erst die passive Sensibilisierung und anschließende Inkubation mit dem Antigen TDI (sen+) führten zu einem deutlichen Anstieg der TNF α -mRNA (Abb. 26). Wurde in der RT-PCR RNA eingesetzt, die erst 24 Stunden nach TDI-Stimulation isoliert wurde, konnte keine mRNA für TNF α nachgewiesen werden.

4.2.2.6 Intrazelluläre TNF α -Konzentration

Da der Nachweis der mRNA keinen Rückschluß auf die Proteinkonzentration erlaubt, wird im Folgenden die intrazelluläre TNF α -Konzentration in Keratinozyten als Reaktion auf die passive Sensibilisierung beschrieben.

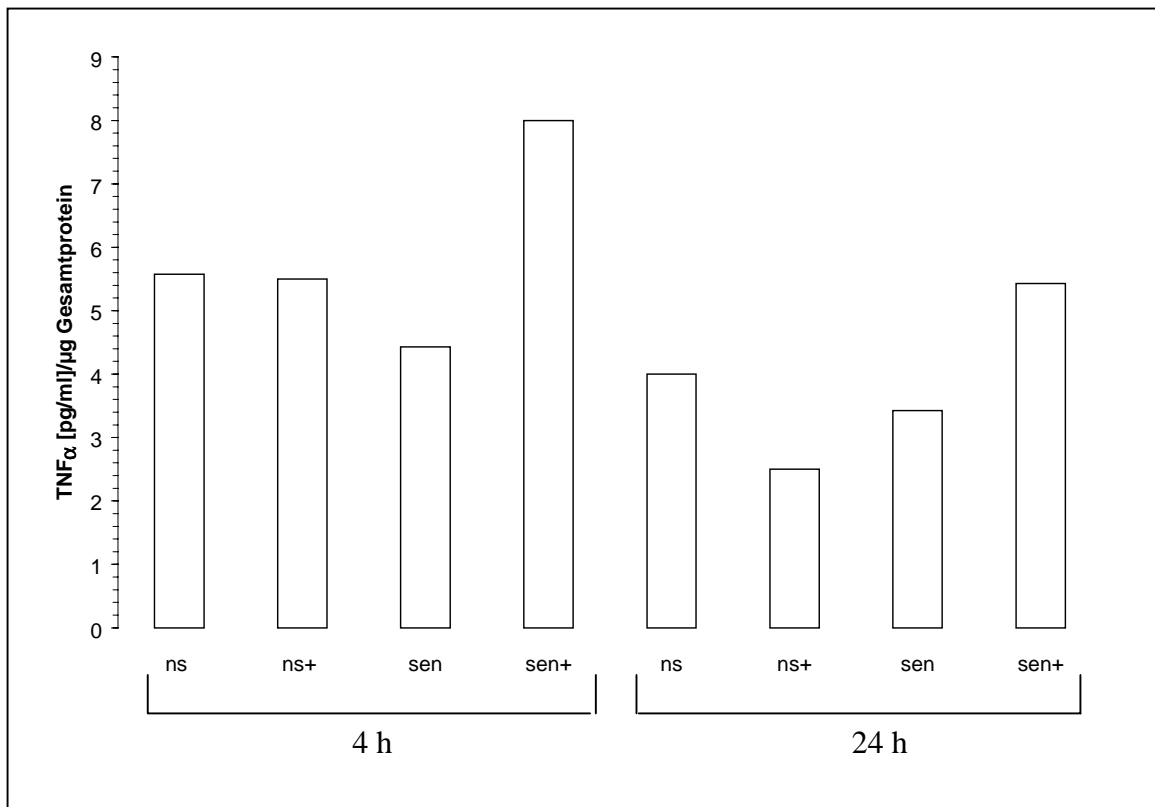


Abbildung 27: Intrazelluläre TNF α -Konzentration in Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung. Bestimmung mittels TNF α -DuoSet. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI.

Die Ergebnisse der intrazellulären TNF α -Messungen sind analog zu Bestimmungen der mRNA für TNF α . Vier Stunden nach der Behandlung der Keratinozyten mit TDI konnte intrazellulär ein Anstieg der TNF α -Konzentration in passiv sensibilisierten und zusätzlich mit TDI behandelten Zellen (8,0 pg/ μ g Gesamtprotein) nachgewiesen werden. In nicht sensibilisierten Keratinozyten wurden 5,5 pg/ml TNF α / μ g Gesamtprotein gemessen. Dabei hatte eine zusätzliche Antigen-Behandlung der Keratinozyten keinen Einfluß auf das Meßergebnis. In Keratinozyten, die nur mit sensibilisiertem Mäuseplasma behandelt wurden, wurde eine TNF α -Menge von 4,4 pg/ μ g Gesamtprotein bestimmt. Wurden die intrazellulä-

ren TNF α -Konzentrationen 24 Stunden nach der TDI-Behandlung bestimmt, zeigte sich in allen Gruppen eine reduzierte Zytokinmenge (Abb. 27). Dies stimmt mit den Ergebnissen der RT-PCR überein. Wurde die mRNA 24 Stunden nach TDI-Behandlung isoliert, konnten keine Banden für TNF α -mRNA nachgewiesen werden. Dies ließ darauf schließen, dass nach der Behandlung mit TDI in passiv sensibilisierten Keratinozyten zunächst die mRNA für TNF α gebildet wurde, woran sich die Proteinbiosynthese von TNF α anschloß. In Folge dessen kam es zu einem Anstieg der intrazellulären TNF α -Konzentration. Anschließend wurde das Zytokin offenbar nach außen abgegeben, so dass die intrazelluläre TNF α -Menge innerhalb von 20 Stunden sank.

4.2.2.7 Nachweis von IL-1 β (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von IL-1 β nach vorheriger Stimulierung der Keratinozyten mit IL-4 zu sehen. Dieser Nachweis wurde mit einem IL-1 β -Quantikine® M-ELISA durchgeführt.

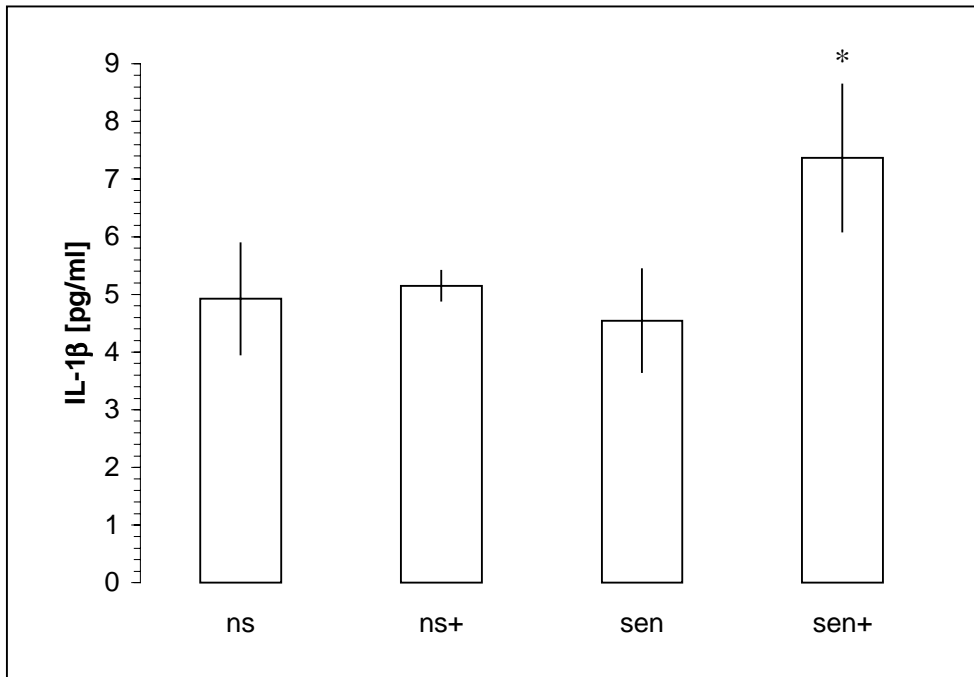


Abbildung 28: IL-1 β -Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels IL-1 β ELISA. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns.

Alle Zellen wurden vor der Zugabe des Mäuseplasmas mit 100 pg/ml IL-4 über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt.

In der unbehandelten Kontrollgruppe wurde eine IL-1 β -Konzentration von $4,9 \pm 0,9$ pg/ml im Zellkulturüberstand gemessen. In der Gruppe, die nur mit dem Antigen TDI behandelt wurde, wurde eine geringfügig gesteigerte Konzentration von $5,2 \pm 0,3$ pg/ml festgestellt. Die alleinige Behandlung der Zellen mit sensibilisiertem Mäuseplasma führte zu einer Freisetzung von $4,5 \pm 0,9$ pg/ml IL-1 β . Nur in passiv sensibilisierten und zusätzlich mit

dem Antigen TDI behandelten Keratinozyten konnte eine - im Vergleich zu den Kontrollgruppen - deutlich angestiegene IL-1 β -Konzentration von $7,4 \pm 1,3$ pg/ml gemessen werden (Abb. 28).

4.2.2.8 Nachweis von IL-10 (nach vorheriger Stimulation der Keratinozyten mit IL-4)

In der folgenden Abbildung ist die Freisetzung von IL-10 nach vorheriger Stimulierung der Keratinozyten mit IL-4 zu sehen. Dieser Nachweis wurde mit einem IL-10-Quantikine® M-ELISA durchgeführt.

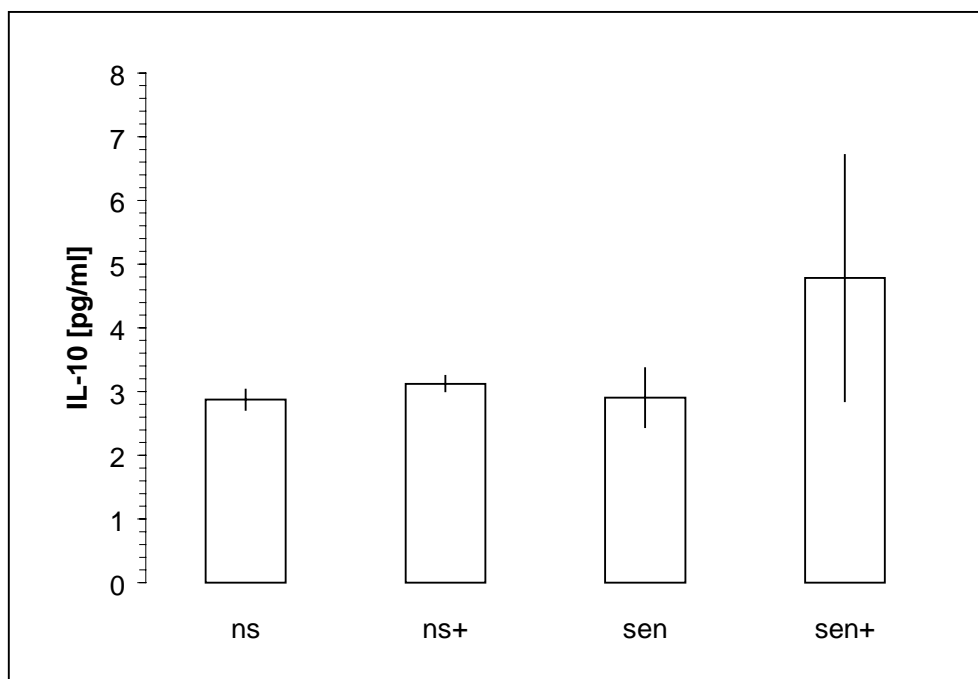


Abbildung 29: IL-10-Freisetzung aus Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels IL-10 ELISA. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unterschiedlichen Versuchen.

Im Überstand der nicht sensibilisierten Kontrollgruppe wurde eine IL-10-Konzentration von $2,9 \pm 0,2$ pg/ml gemessen. Eine Inkubation von nicht sensibilisierten Zellen mit TDI führte zu einer IL-10-Freisetzung von $3,1 \pm 0,1$ pg/ml. Wurden die Keratinozyten durch die Inkubation mit sensibilisiertem Mäuseplasma passiv sensibilisiert, wurden $2,9 \pm 0,5$ pg IL-10/ml gemessen. In Keratinozyten, die nach der passiven Sensibilisierung zusätzlich mit dem Antigen TDI behandelt wurden, wurden $4,8 \pm 1,9$ pg IL-10/ml freigesetzt (Abb. 29).

4.2.3 Abhängigkeit der Reaktion vom Zeitpunkt der Plasmagewinnung nach TDI-Behandlung der Mäuse

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob das Alter des Plasmas eine Auswirkung auf die Reaktion der Zellen hat. Das Alter des Plasmas bezieht sich auf den zeitlichen Abstand zwischen der Plasmagewinnung und TDI-Behandlung der Mäuse.

4.2.3.1 Einfluß der passiven Sensibilisierung auf die Vitalität der MSC-P5-Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt der passiven Sensibilisierung auf die Keratinozyten auszuschließen, wurde die Vitalität der Zellen im Anschluß an die Versuche bestimmt (vgl. 3.2.4).

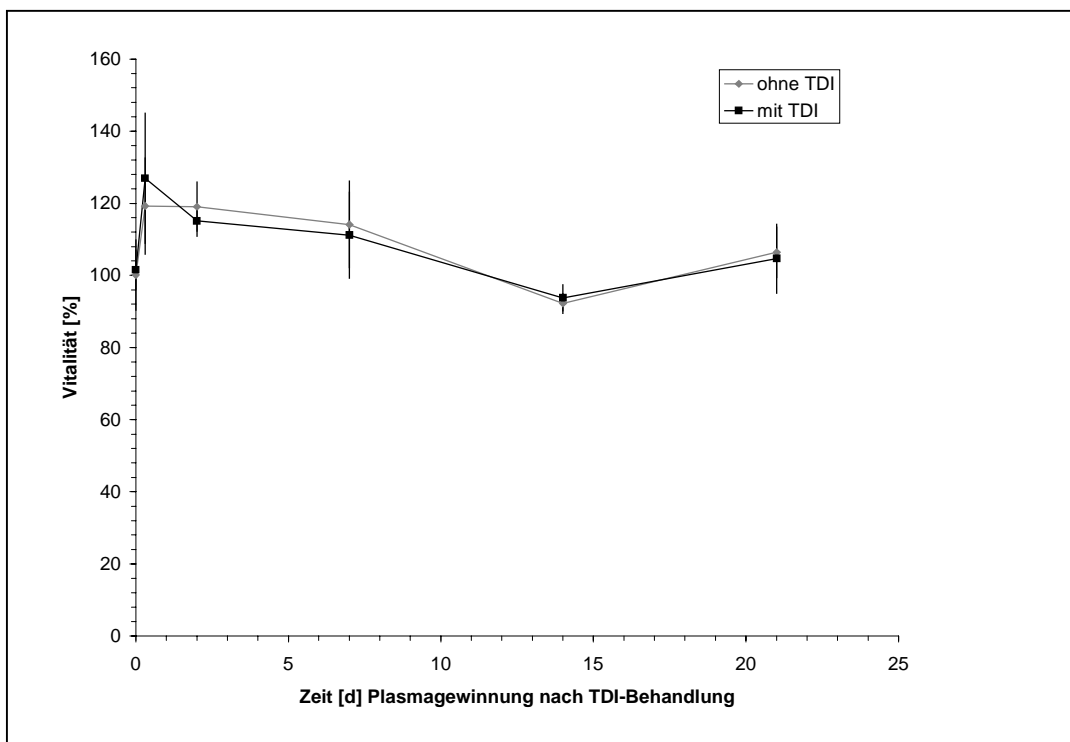


Abbildung 30: Bestimmung der prozentualen Vitalität nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma (Cell Titer®). Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen.

Das Plasma wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von Mäusen gewonnen. In Relation zum unbehandelten Kontrollgruppe steigerte das Plasma, das sechs Stunden nach TDI-Behandlung von den Mäusen gewonnen wurde, die Umsetzung des Tetrazoliums Salzes zu Formazan. In der Gruppe, die nicht zusätzlich mit TDI inkubiert wurde, wurde ein um

19 % gesteigerter Tetrazoliumumsatz gemessen. Die Behandlung mit Antigen führte zu einem um 26 % erhöhten Umsatz des Tetrazoliumsalzes. Keratinozyten, die mit Plasma behandelt wurden, das zwei Tage nach TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde, zeigten bezogen auf die Kontrolle eine Vitalität von 119 bzw. 115 %. Plasma, das nach 7 Tagen den Mäusen abgenommen wurde, führte zu einem Tetrazoliumumsatz, der nur geringfügig im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert war (114 bzw. 111 %). Diese Werte sanken unter den 100 %-Wert bei Keratinozyten, die mit sensibilisiertem Plasma inkubiert wurden, das nach zwei Wochen gewonnen wurde. Die Vitalität der Keratinozyten, die drei Wochen altes Plasma erhielten, erreichte wieder den Ausgangswert der unbehandelten Kontrolle (106 bzw. 105 %). Während des Versuchs zeigte sich zwischen den Keratinozyten, die mit bzw. ohne TDI behandelt wurden, kein Unterschied (Abb. 30). Die Behandlung der Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen hatten keinen zytotoxischen Effekt auf die MSC-P5-Zellen.

4.2.3.2 Effekt der Zeitspanne zwischen Plasmagewinnung und TDI-Behandlung der Mäuse auf die Freisetzung von TNF α

Im Folgenden wird die Freisetzung von TNF α von passiv sensibilisierten Keratinozyten beschrieben. Zur Sensibilisierung wurde Mäuseplasma eingesetzt, das zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung der Mäuse mit TDI gewonnen wurde. Die freigesetzte TNF α -Menge wurde mit einem TNF α -DuoSet bestimmt

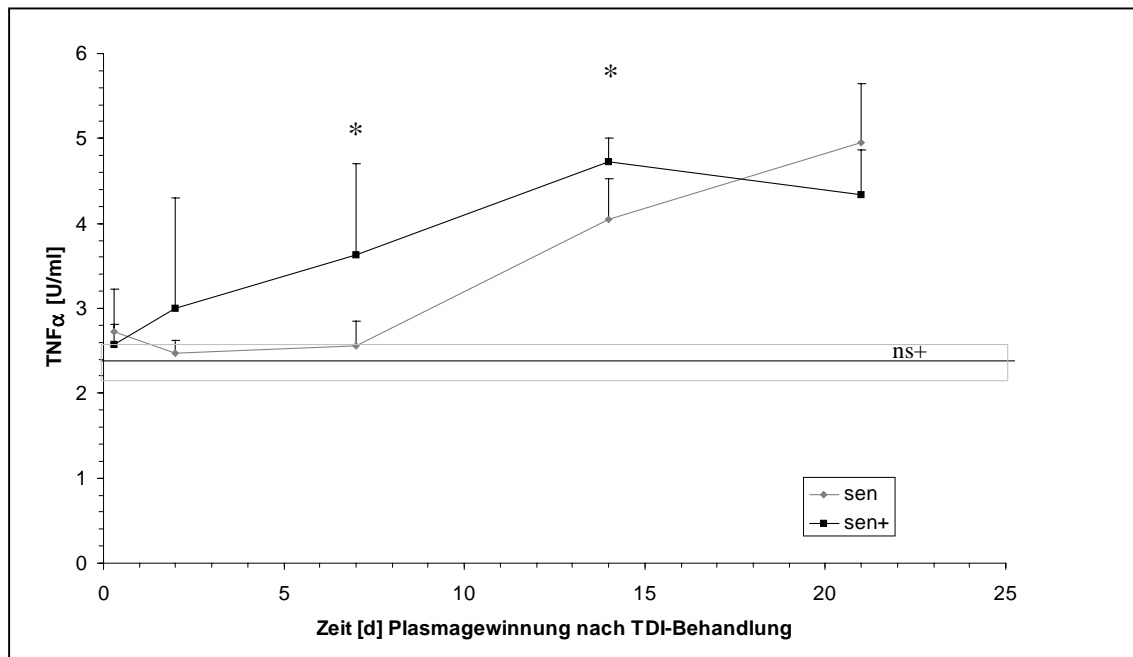


Abbildung 31: Bestimmung der TNF α -Freisetzung nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma. Bestimmung im TNF α -DuoSet. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs einzelnen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu sen.

Die Kulturen, die mit nicht sensibilisiertem Plasma behandelt wurden, setzten ca. $2,5 \pm 0,2$ U TNF α /ml Kulturüberstand frei. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen nach der Behandlung mit dem Plasma zusätzlich mit TDI behandelt wurden ($2,4 \pm 0,1$ U TNF α /ml).

Keratinozyten, die nach der Behandlung mit sensibilisiertem Plasma nicht mit TDI inkubiert wurden, setzten weniger als 2,8 U TNF α /ml in den Kulturüberstand frei. Wurde jedoch Plasma verwendet, das von Mäusen gewonnen wurde, deren TDI-Behandlung mindestens zwei Wochen zurücklag, stieg die freigesetzte TNF α -Menge der Keratinozyten auf

4,0 ± 0,5 U/ml. Eine weitere Steigerung der TNF α -Konzentration wurde in Überständen von Keratinozyten gemessen, die mit 21 Tage altem Plasma behandelt wurden (4,9 ± 0,7 U/ml). Zellen, die nach der passiven Sensibilisierung zusätzlich mit TDI inkubiert wurden, zeigten schon bei 2 Tage altem Plasma eine gesteigerte TNF α -Freisetzung (3 ± 1,3 U/ml). Die freigesetzte TNF α -Menge ließ sich durch die Verwendung von 7 bzw. 14 Tage altem Plasma steigern (3,63 ± 1,0 bzw. 4,73 ± 0,3 U/ml). Durch die Inkubation mit 21 Tage altem Plasma sank die TNF α -Konzentration im Zellkulturüberstand wieder leicht auf 4,34 ± 0,5 U/ml (Abb. 31).

4.2.3.3 Effekt der Zeitspanne zwischen Plasmagewinnung und TDI-Behandlung der Mäuse auf die Freisetzung von IL-1 β

Um das Ergebnis des vorangegangenen Versuchs mit einem anderem Parameter zu bestätigen, wurde in einem weiteren Ansatz die IL-1 β -Menge, die von passiv sensibilisierten Keratinozyten freigesetzt wurde, bestimmt. Das Plasma, das zur Sensibilisierung verwendet wurde, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen.

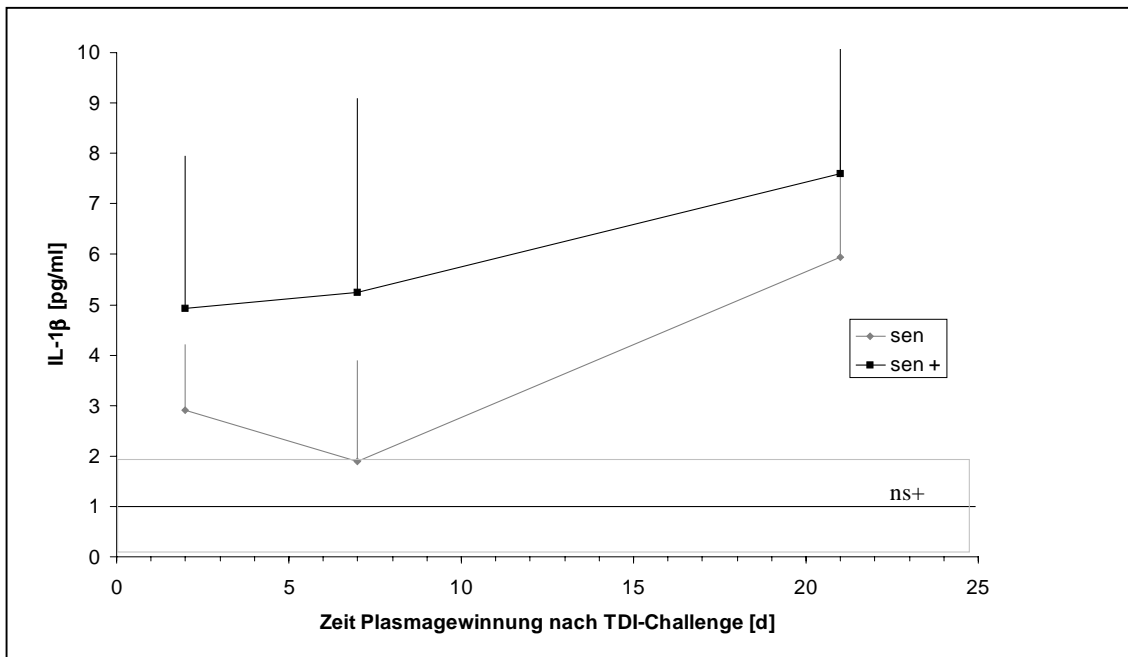


Abbildung 32: Bestimmung der IL-1 β -Freisetzung nach der Behandlung mit sensibilisiertem Mäuseplasma. Bestimmung im IL-1 β -ELISA. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs einzelnen Versuchen.

Analog zu den vorher gemessenen Mengen von TNF α im Überstand passiv-sensibilisierter Keratinozyten wurden ebenfalls unterschiedliche IL-1 β -Mengen freigesetzt, wenn Plasma zur Sensibilisierung eingesetzt wurde, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde.

Die freigesetzten IL-1 β -Mengen von Zellen, die mit nicht sensibilisiertem Plasma behandelt wurden, lagen bei unbehandelten Keratinozyten bei $4,0 \pm 1,5$ pg/ml und bei zusätzlich mit TDI behandelten Zellen bei $1,1 \pm 1,2$ pg/ml. Bei Keratinozyten, die mit sensibilisiertem Plasma behandelt und zusätzlich mit TDI inkubiert wurden, stieg die freigesetzte IL-1 β -Menge in Abhängigkeit des Alters des gewonnenen Plasmas stetig an. Die Verwendung 2 Tage alten Plasmas induzierte die Freisetzung von $5,0 \pm 3,0$ pg/ml IL-1 β . Diese Konzentration konnte durch Verwendung von 7 Tage altem ($5,3 \pm 3,8$ pg/ml) bzw. 21 Tage altem Plasma ($7,6 \pm 2,5$ pg/ml) noch gesteigert werden. Dagegen blieb die IL-1 β -Konzentration in Überständen von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die nicht mit TDI behandelt wurden, relativ konstant. Bei Verwendung von bis zu 7 Tage altem Plasma lag die freigesetzte IL-1 β -Konzentration zwischen $2,9 \pm 1,3$ und $1,9 \pm 2,0$ pg/ml. Wurde jedoch 21 Tage altes Plasma verwendet, stieg das gemessene IL-1 β sprunghaft auf $6,0 \pm 2,9$ pg/ml an (Abb. 32).

4.2.4 Zeitverlauf der Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung

In den folgenden Untersuchungen sollte der zeitliche Verlauf der Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-10 nach der Behandlung der Keratinozyten mit dem Antigen TDI untersucht werden.

4.2.4.1 Zeitverlauf der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung aus Keratinozyten

Im Folgenden wird die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ von passiv sensibilisierten Keratinozyten beschrieben. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung der MSC-P5-Zellen mit TDI gewonnen. Die freigesetzte $\text{TNF}\alpha$ -Menge wurde mit einem $\text{TNF}\alpha$ -DuoSet bestimmt.

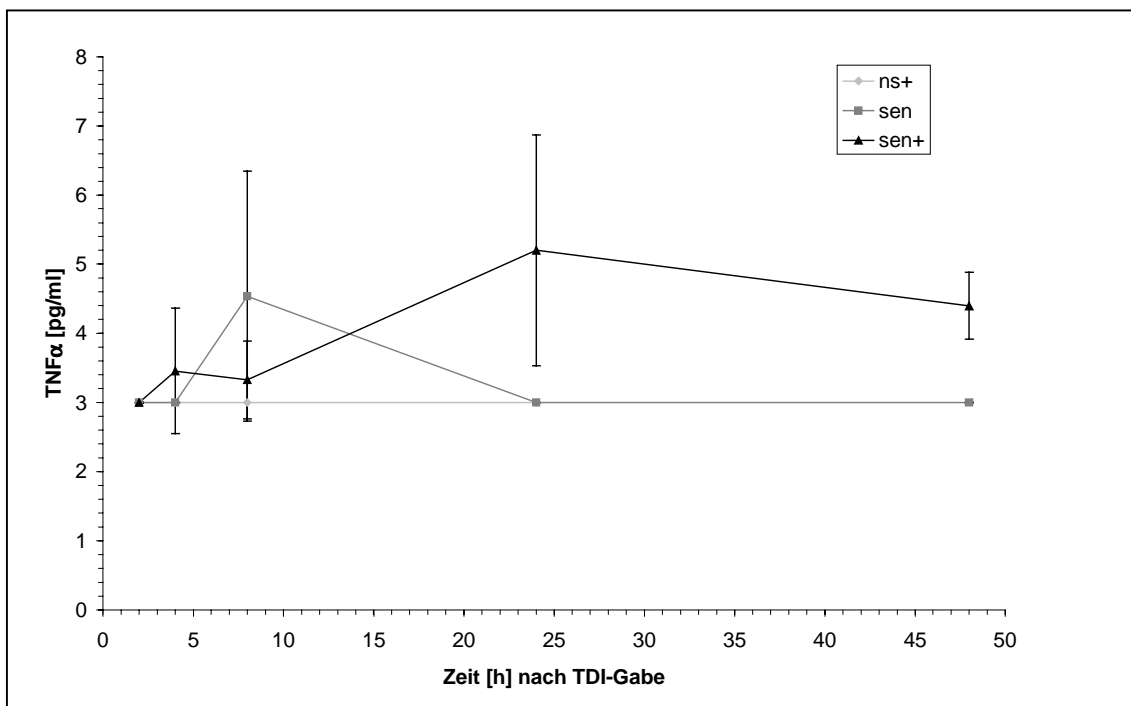


Abbildung 33: $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels $\text{TNF}\alpha$ -DuoSet. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von vier einzelnen Versuchen.

Die alleinige Behandlung der Keratinozyten mit dem Antigen führte nicht zu einer Freisetzung von meßbaren TNF α -Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme. Im Überstand von Zellen, die nur mit sensibilisierten Mäuseplasma behandelt wurden, konnte acht Stunden nach der TDI-Gabe eine TNF α -Konzentration von $4,45 \pm 1,8$ pg/ml bestimmt werden. Zu den übrigen Zeitpunkten lagen die gemessenen Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Keratinozyten, die passiv sensibilisiert und anschließend mit dem Antigen TDI behandelt wurden, setzten vier Stunden nach der TDI-Zugabe $3,45 \pm 0,9$ pg/ml TNF α frei. Nach acht Stunden konnten $3,3 \pm 0,5$ pg/ml TNF α im Überstand nachgewiesen werden. Das Maximum der TNF α -Freisetzung wurde nach 24 Stunden erreicht. Hier wurden $5,2 \pm 1,7$ pg/ml TNF α im Zellkulturüberstand bestimmt. Nach 24 Stunden sank der gemessene TNF α -Wert auf $4,4 \pm 0,5$ pg/ml. Mit Ausnahme der frühen Zeitpunkte bis acht Stunden nach Antigenzugabe, lagen die freigesetzten TNF α -Mengen in Überständen der passiv sensibilisierten und zusätzlich mit TDI behandelten Keratinozyten über den gemessenen Werten der übrigen Kontrollgruppen (Abb. 33).

4.2.4.2 Zeitverlauf der IL-1 β -Freisetzung aus Keratinozyten

Im Folgenden wird die Freisetzung von IL-1 β von passiv sensibilisierten Keratinozyten beschrieben. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung der MSC-P5-Zellen mit TDI gewonnen. Die freigesetzte IL-1 β -Menge wurde mit einem IL-1 β -Quantikine® M-ELISA bestimmt.

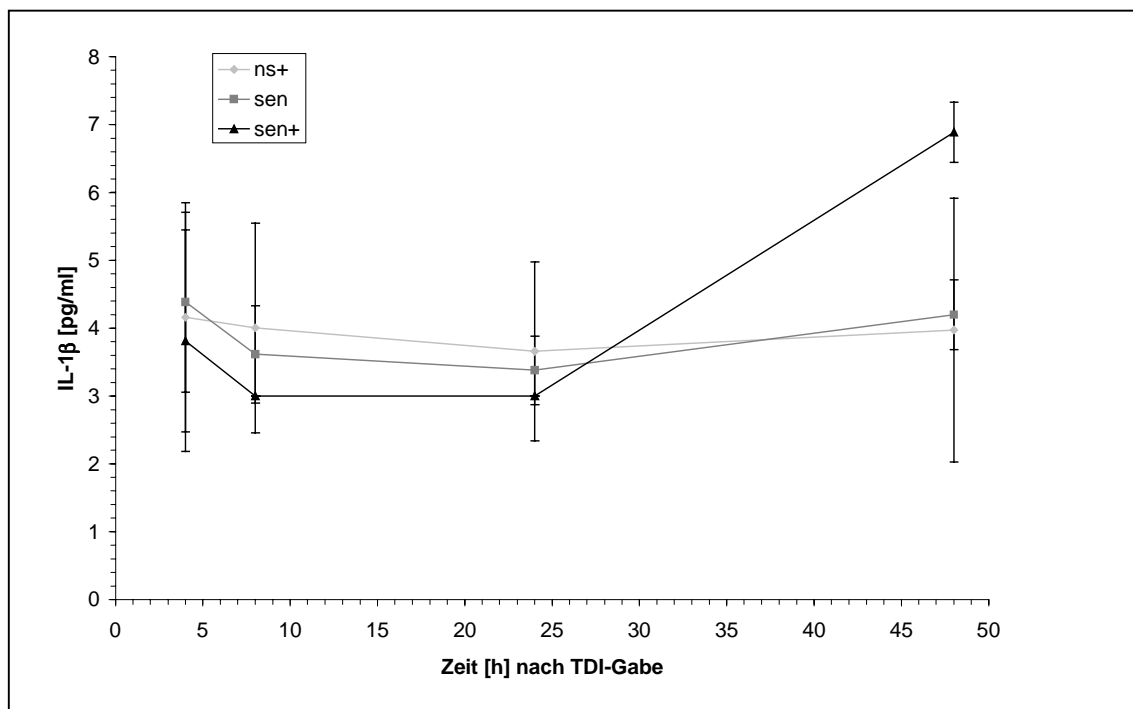


Abbildung 34: IL-1 β -Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels IL-1 β -ELISA. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von vier einzelnen Versuchen.

Die Kontrollgruppe, die nur mit dem Antigen TDI behandelt wurde, setzte 4 Stunden nach der TDI-Zugabe $4,2 \pm 1,7$ pg/ml IL-1 β frei. Die gemessene Konzentration blieb nach acht Stunden ($4,0 \pm 1,6$ pg/ml), nach 24 Stunden ($3,7 \pm 1,3$ pg/ml) und nach 48 Stunden ($4,0 \pm 1,9$ pg/ml) nahezu konstant. Auch die IL-1 β -Mengen in Überständen von Keratinozyten, die nur mit sensibilisiertem Mäuseplasma behandelt wurden änderten sich nur geringfügig. Nach vier Stunden konnte eine IL-1 β -Konzentration von $4,4 \pm 1,3$ pg/ml bestimmt werden. Nach acht Stunden sank dieser Wert auf $3,6 \pm 0,7$ pg/ml. 24 Stunden nach der Antigenu-

gabe wurden $3,4 \pm 0,5$ pg/ml IL-1 β freigesetzt. Nach 48 Stunden stieg die gemessene Konzentration auf $4,2 \pm 0,5$ pg/ml. Die IL-1 β -Konzentrationen in Überständen von Keratinozyten, die passiv sensibilisiert und anschließend mit TDI behandelt wurden, unterschieden sich bis 24 Stunden nach TDI-Zugabe nicht wesentlich von den Kontrollgruppen. So wurde in Überständen von Kulturen nach vier Stunden eine IL-1 β -Konzentration von $3,8 \pm 1,6$ pg/ml festgestellt. Weitere vier Stunden später lag die nachgewiesene Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Auch 24 Stunden nach Zugabe von TDI konnte kein IL-1 β im Überstand nachgewiesen werden. Erst nach 48 Stunden setzten diese Keratinozyten $6,9 \pm 0,4$ pg/ml IL-1 β frei (Abb. 34).

4.2.4.3 Zeitverlauf der IL-10-Freisetzung aus Keratinozyten

Im Folgenden wird die Freisetzung von IL-10 von passiv sensibilisierten Keratinozyten beschrieben. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung der MSC-P5-Zellen mit TDI gewonnen. Die freigesetzte IL-10-Menge wurde mit einem IL-10-Quantikine® M-ELISA bestimmt.

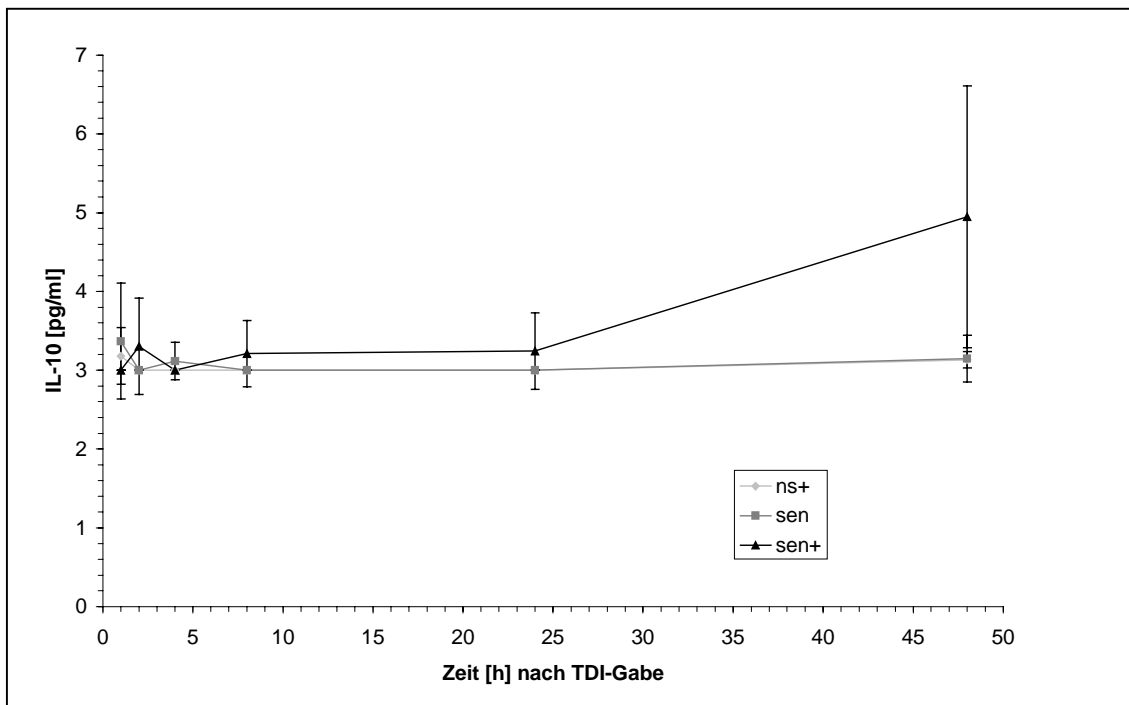


Abbildung 35: IL-10-Konzentration im Überstand von sensibilisierten Keratinozyten in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach TDI-Behandlung. Bestimmung mittels IL-10-ELISA. ns = Keratinozyten mit Plasma von nicht sensibilisierten Mäusen behandelt, sen = Keratinozyten mit Plasma von sensibilisierten Mäusen behandelt, + = zusätzliche Inkubation mit TDI. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von vier einzelnen Versuchen.

Keratinozyten, die nur mit dem Antigen TDI behandelt wurden, setzten ca. 3 pg/ml IL-10 frei. Dabei spielte der Zeitpunkt der Probennahme keine Rolle. Die Behandlung der Keratinozyten mit sensibilisiertem Mäuseplasma induzierte keine gesteigerte Freisetzung von IL-10 im Vergleich zu nicht sensibilisierten und mit TDI behandelten Zellen. Nur die Keratinozyten, die passiv sensibilisiert und zusätzlich mit TDI inkubiert wurden, setzten nach 48 Stunden eine IL-10-Menge von $4,9 \pm 1,7$ pg/ml frei (Abb. 35).

4.3 Interaktion zwischen Keratinozyten und Endothelzellen

Um einen Aspekt der Rolle von Keratinozyten in immunologisch bedingten Abwehrreaktionen der Haut nachzuweisen, sollte der Einfluß von Keratinozyten auf Endothelzellen untersucht werden. Im folgenden werden die Ergebnisse von Versuchen beschrieben, in denen Endothelzellen mit dem Überstand passiv sensibilisierter Keratinozyten behandelt wurden.

4.3.1 Einfluß von Keratinozyten auf die Proliferation von Endothelzellen

Es sollte der Einfluß des Überstandes von passiv sensibilisierten Keratinozyten auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen untersucht werden. Dieser Versuch sollte die Fähigkeit von Keratinozyten auf eine mögliche Regulation der Endothelzell-Proliferation aufzeigen.

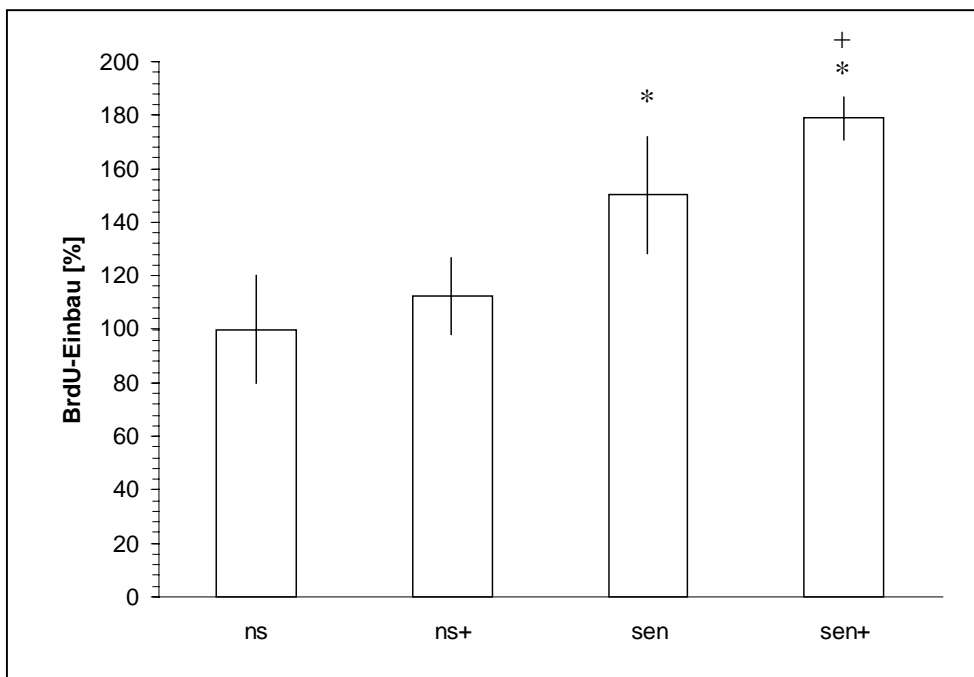


Abbildung 36: Proliferation von bend.3-Zellen nach der Behandlung mit Zellkulturüberstand von sensibilisierten Keratinozyten (ns = 100 %). ns = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von nicht sensibilisierten Keratinozyten, ns+ = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von nicht sensibilisierten aber mit TDI inkubierten Keratinozyten, sen = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von sensibilisierten Keratinozyten, sen+ = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von sensibilisierten und mit TDI inkubierten Keratinozyten. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs einzelnen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns. + = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu sen.

Die Proliferation von Zellen, die mit dem Überstand von nicht sensibilisierten, aber mit TDI behandelten Keratinozyten inkubiert wurden, unterscheidet sich nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe. Wurden dagegen die Keratinozyten passiv sensibilisiert, dann steigerte deren Überstand die Proliferation der bend.3-Zellen um etwa 50 %. Eine zusätzliche Inkubation der passiv sensibilisierten Keratinozyten mit TDI führte zu einer um 80 % gesteigerten Proliferation im Vergleich zu den nicht sensibilisierten Kontrollgruppen (Abb. 36).

4.3.2 Induktion der Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen

Im Folgenden wird der Einfluß des Überstandes passiv sensibilisierter Keratinozyten auf die Expression von VCAM-1 bei Endothelzellen beschrieben. Dieser Versuch sollte die Fähigkeit von Keratinozyten auf eine mögliche Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Endothelzellen aufzeigen.

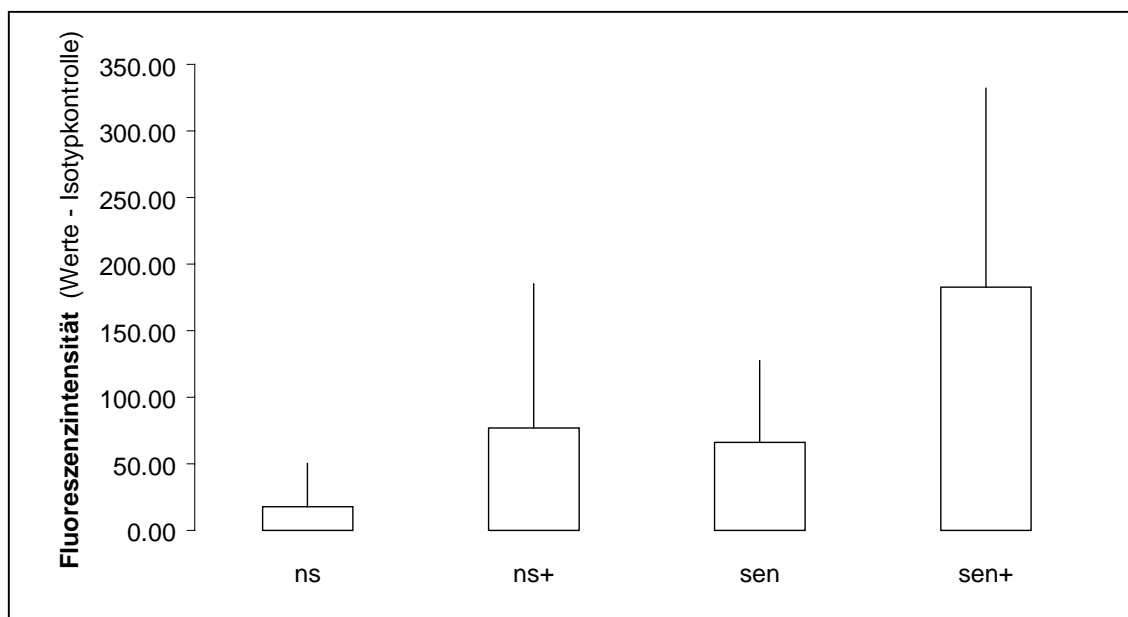


Abbildung 37: Nachweis von VCAM-1 auf Endothelzellen mittels FITC-markierter Antikörper im FluoroskanII. Unspezifische Fluoreszenzintensität wurde von der Fluoreszenzintensität des VCAM-1-Antikörpers subtrahiert. ns = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von nicht sensibilisierten Keratinozyten, ns+ = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von nicht sensibilisierten, aber mit TDI inkubierten Keratinozyten, sen = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von sensibilisierten Keratinozyten, sen+ = bend.3-Zellen behandelt mit Überstand von sensibilisierten und mit TDI inkubierten Keratinozyten. Angabe von Mittelwert + Standardabweichung von fünf einzelnen Versuchen.

Endothelzellen, die mit dem Überstand von nicht sensibilisierten Keratinozyten behandelt wurden, keine gesteigerte Ausbildung des Adhäsionsmoleküls. Eine Behandlung der Zellen mit dem Überstand von ns⁺-Keratinozyten zeigten eine um 330 % gesteigerte Ausbildung des VCAM-1 Rezeptors. Wurden die Endothelzellen mit dem Überstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten inkubiert, konnte ein Fluoreszenzwert gemessen werden, der um 270 % gegenüber der Kontrolle gestiegen war. Die Behandlung der Endothelzellen mit dem Überstand von passiv sensibilisierten und zusätzlich mit TDI inkubierten Keratinozyten induzierte eine um 925 % vermehrte Expression (Abb. 37). Da die Streuung der einzelnen Meßwerte sehr groß war, kann nur von einer tendenziösen Steigerung von VCAM-1 auf Endothelzellen, die mit Überstand von sensibilisierten und mit TDI inkubierten Keratinozyten behandelt wurden, ausgegangen werden.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass Keratinozyten über Freisetzung von Mediatoren in der Lage sind die Zellteilungsaktivität von Endothelzellen und die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen zu beeinflussen.

4.4 Sensibilisierung von Keratinozyten mit isoliertem IgE

Die Keratinozyten wurden passiv sensibilisiert, indem sie mit reinem IgE behandelt wurden.

Analog zu Versuchen von BÈCHEREL et al. (1991) sollten Keratinozyten durch Inkubation mit reinem IgE sensibilisiert werden. Durch die Verwendung von reinem IgE anstelle des Mäuseplasmas wäre eine größere Standardisierung der Versuche möglich. Das IgE war spezifisch für Dinitrophenol (DNP).

4.4.1 Bestimmung der geeigneten IgE-Verdünnung

Im folgenden wurden Keratinozyten mit IgE in unterschiedlichen Verdünnungen passiv sensibilisiert. Die freigesetzte TNF α -Menge wurde mit einem TNF α -DuoSet gemessen.

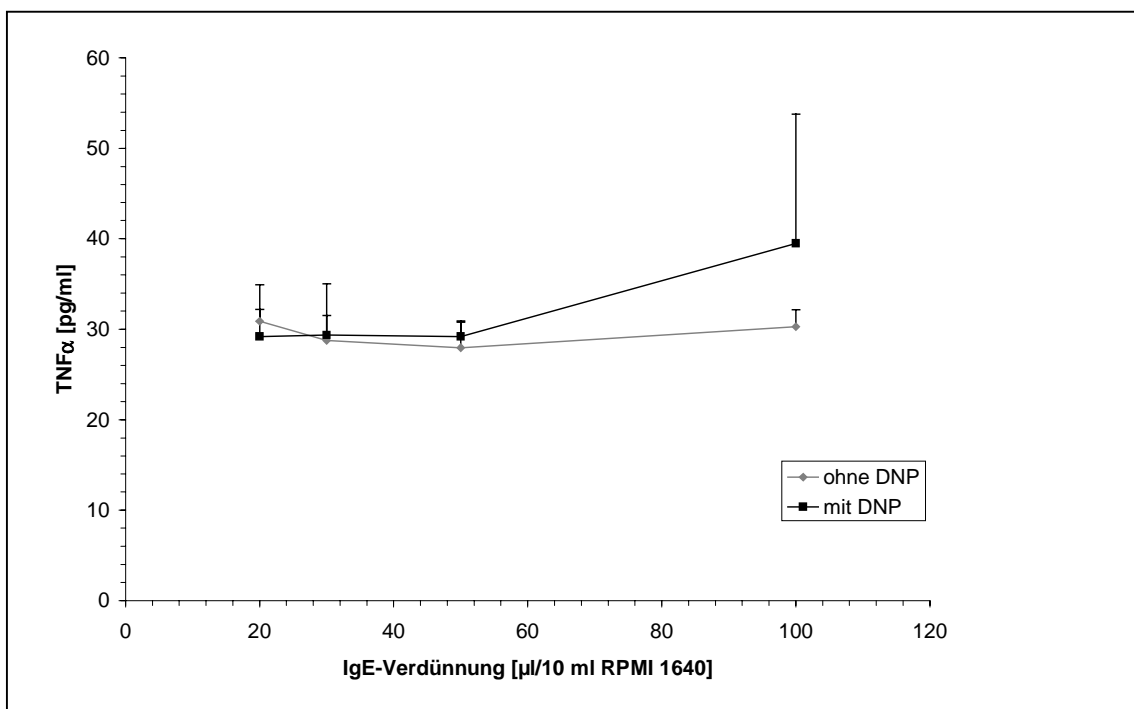


Abbildung 38: Freisetzung von TNF α aus Keratinozyten 48 Stunden nach DNP-BSA Inkubation. Bestimmung mittels TNF α -DuoSet. Angabe von Mittelwert + Standardabweichung aus sechs einzelnen Versuchen.

Es sollte die freigesetzte TNF α -Menge aus sensibilisierten Keartinozyten in Abhängigkeit von der eingesetzten IgE-Verdünnung untersucht werden. Als Kontrollgruppe dienten Ke-

ratinozyten, die mit IgE sensibilisiert wurden, jedoch anschließend nicht mit DNP behandelt wurden. Es zeigt sich bei einer eingesetzten IgE-Konzentration von 50 μ l/10 ml RPMI 1640-Kulturmedium kein Unterschied in der freigesetzten TNF α -Menge zwischen Keratinozyten, die mit DNP behandelt wurden, und der Kontrollgruppe. Die gemessenen TNF α -Konzentrationen lagen jeweils zwischen 27 und 31 pg/ml. Bei einer eingesetzten IgE-Verdünnung von 100 μ l/10 ml RPMI 1640-Kulturmedium wurden nach der Behandlung mit DNP $39,5 \pm 14,32$ pg/ml TNF α im Überstand nachgewiesen. In der nicht mit DNP behandelten Kontrollgruppe lag die gemessene TNF α -Konzentration bei $30,3 \pm 3,58$ pg/ml. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 38).

4.4.2 Bestimmung der freigesetzten TNF α -Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten DNP-BSA-Konzentration

Um deutlichere Unterschiede zwischen behandelten und nicht IgE behandelten Keratinozyten hinsichtlich der TNF α -Freisetzung zu erzielen, wurde die eingesetzte Antigen-Konzentration erhöht.

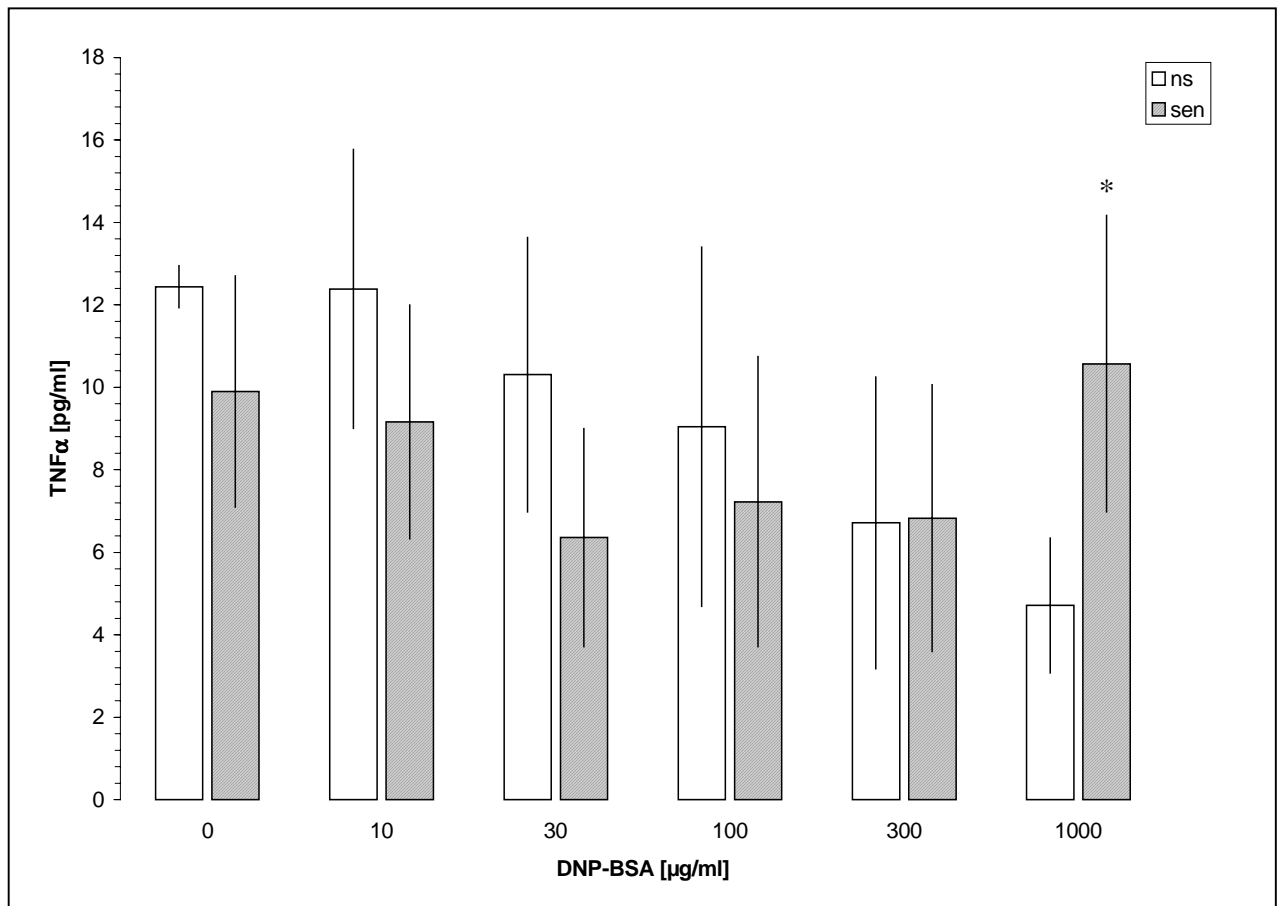


Abbildung 39: TNF α -Konzentration in Überständen von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die mit unterschiedlichen DNP-BSA-Konzentrationen inkubiert wurden. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unterschiedlichen Versuchen. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns 1000 $\mu\text{g/ml}$ DNP-BSA.

Im Überstand von Keratinozyten, die nur mit RPMI 1640-Medium behandelt wurden, konnte eine TNF α -Konzentration von $12,4 \pm 0,51$ pg/ml bestimmt werden. Eine anschließende Inkubation mit DNP-BSA-Immunkomplexen führte nicht zu einer gesteigerten Freisetzung von TNF α ($9,9 \pm 2,81$ pg/ml). Die gemessene TNF α -Konzentration nahm mit zunehmender DNP-BSA-Konzentration stetig ab. So wurde bei einer DNP-BSA Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ nur noch $9,0 \pm 4,3$ pg/ml TNF α gemessen. Wurden 1000 $\mu\text{g/ml}$ DNP-

BSA zur Behandlung der Keratinozyten eingesetzt, so setzten die Zellen $4,71 \pm 1,63$ pg/ml TNF α frei. Wurden dagegen die Zellen nach der passiven Sensibilisierung mit anti-DNP-IgE zusätzlich mit DNP-BSA behandelt, setzten die Zellen bei der höchsten Antigenkonzentration $10,6 \pm 3,6$ pg/ml TNF α frei. Dieser Wert liegt über der freigesetzten TNF α -Konzentration der Kontrollgruppe. Wurden niedrigere Konzentrationen DNP-BSA verwendet, lagen die freigesetzten TNF α -Mengen (9,9 bis 6,8 pg/ml) deutlich unter denen der Kontrollgruppe.

Die Reaktion der Keratinozyten als Folge der passiven Sensibilisierung mit reinem IgE war im Vergleich zu Untersuchungen, in denen die Zellen mit Mäuseplasma sensibilisiert wurden, nicht so ausgeprägt (Abb. 39).

5 DISKUSSION

Untersuchungen von RABE et al. (1998) zeigten, dass eine passive Sensibilisierung von Zellen durch Zusatz von Serum sensibilisierter Patienten induzierbar ist. Als Grundvoraussetzung für eine passive Sensibilisierung gilt die Existenz Immunglobulinbindender Rezeptoren. In eigenen Untersuchungen konnten für MSC-P5-Zellen der FcεRII und FcγR nachgewiesen werden (Abb. 16, 17 u. 18). Durch die Behandlung mit IL-4, die nach DELEPESSE et al. (1991) die Expression von FcεRII steigert, konnte in eigenen Versuchen keine vermehrte Bildung dieses Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 14, 15 u. 16). Nachdem gezeigt werden konnte, dass MSC-P5-Zellen Stickstoffmonoxid freisetzen können (Abb. 7 u. 8), sollte die Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung mit diesem Parameter zunächst beurteilt werden. Es zeigte sich, dass Keratinozyten, die mit IL-4 vorinkubiert wurden, auf die passive Sensibilisierung und zusätzliche TDI-Inkubation mit der Freisetzung von Stickstoffmonoxid reagierten (Abb. 23). Wurden dagegen die Zellen nicht mit IL-4 vorinkubiert, setzten die Keratinozyten nicht vermehrt Stickstoffmonoxid frei (Abb. 22). Der gleiche Effekt zeigte sich auch für die Freisetzung von TNFα (Abb. 24 u. 25). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden die Keratinozyten fortan immer mit IL-4 vorinkubiert, bevor die passive Sensibilisierung durchgeführt wurde. Um die Ergebnisse der TNFα-Messungen abzusichern, wurde außerdem auch die mRNA für TNFα in Keratinozyten bestimmt (Abb. 26). Zusätzlich wurde auch die intrazelluläre TNFα-Konzentration gemessen (Abb. 27). Vier Stunden nach Antigenreiz waren sowohl die mRNA für TNFα als auch die intrazelluläre TNFα-Konzentration in passiv sensibilisierten und zusätzlich mit TDI behandelten Keratinozyten gegenüber den Kontrollgruppen deutlich angestiegen. 24 Stunden nach TDI-Behandlung war keine TNFα-mRNA bzw. keine erhöhte intrazelluläre TNFα-Konzentration mehr nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass TNFα als frühes inflammatorisches Zytokin sehr schnell nach der Induktion gebildet wird, aber seine Synthese binnen Stunden eingestellt wird. Weitere Zytokine, die im Überstand von Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung nachgewiesen wurden, waren IL-1β (Abb. 28) und IL-10 (Abb. 29). Während von passiv sensibilisierten und zusätzlich mit TDI behandelten Keratinozyten signifikant höhere IL-1β-Mengen freigesetzt wurden, war für IL-10 nur ein tendenzieller Anstieg nachweisbar. Als Parameter zur Beurteilung

der passiven Sensibilisierung eigneten sich vor allem TNF α und IL-1 β . Da jedoch die Zytokinkonzentrationen unter gleichen Versuchsbedingungen stark variierten, sollte der Einfluß des Zeitpunktes der Plasmagewinnung auf die Freisetzung von TNF α (Abb. 31) und IL-1 β (Abb. 32) untersucht werden. In diesen Versuchen zeigte sich, dass durch die Verwendung von Plasma, das sieben Tage nach der TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde, die deutlichsten Anstiege erzielt wurden. In weiteren Sensibilisierungsversuchen wurde nur noch Plasma verwendet, das sieben Tage nach TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde. Um den optimalen Zeitpunkt der Zytokinmessung festzulegen, wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach Antigen-Behandlung der Keratinozyten die Zellkulturüberstände gewonnen und auf TNF α (Abb. 33), IL-1 β (Abb. 34) und IL-10 (Abb. 35) untersucht. Die Ergebnisse waren in Überständen, die 48 Stunden nach der TDI-Behandlung analysiert wurden, am deutlichsten. Deshalb wurden diese Überstände verwandt, um die Interaktion zwischen Keratinozyten und Endothelzellen zu untersuchen. Endothelzellen, die die Innenwand der Blutgefäße auskleiden, spielen eine wichtige Rolle während entzündlicher Reaktionen der Haut. Durch eine gesteigerte Proliferation der Endothelzellen wird eine Vasodilatation hervorgerufen. Die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen ist für die Umverteilung von Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Mastzellen aus dem zirkulierenden Blut ins Gewebe erforderlich. Hier sind diese Infiltratzellen für die Eliminierung des Antigens verantwortlich. Durch Inkubation der Endothelzellen mit Überständen von passiv sensibilisierten und zusätzlich TDI-behandelten Keratinozyten konnte deren Zellteilungsaktivität gesteigert werden (Abb. 36). Auch war in dieser Gruppe eine tendenziell stärkere Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 nachzuweisen (Abb. 37). Dies bedeutet, dass Keratinozyten durch die Freisetzung von Mediatoren offenbar einen Einfluß auf Endothelzellen ausüben können. Der Versuch die Sensibilisierung durch die Verwendung von reinem IgE anstelle von undefiniertem Mäuseplasma zu induzieren, führte nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen (Abb. 38 u. 39).

5.1 Nachweis immunglobulinbindender Rezeptoren

Dass Immunglobuline eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen spielen, konnten PRAUSNITZ und KÜSTERS bereits 1921 in ihren Versuchen bestätigen (PRAUSNITZ und KÜSTERS, 1921). Durch die Übertragung von sensibilisiertem Plasma auf nicht sensibili-

sierte Personen, wurden auch diese gegen das Allergen sensibilisiert. Durch die Übertragung von Serum gelang PRAUSNITZ und KÜSTERS (1921) ein passiver Transfer der Überempfindlichkeit. Diese Reaktion konnte auch auf zellulärer Ebene angewandt werden. Durch die Zugabe von Serum von Allergikern zum Kulturmedium wurden Zellen gegenüber dem spezifischen Antigen sensibilisiert (LEVY und OSLER, 1967). Am Anfang wurden tracheale Muskelzellen verwendet, die von allergischen Hunden gewonnen wurden (ANTONISSEN et al., 1979). Diese asthmatischen Hunde zeigten hohe IgE-Titer im Blutserum. Die wichtigsten Merkmale des IgE sind seine Hitzelabilität und die Fähigkeit, an Mastzellen und basophile Granulozyten zu binden. Die Halbwertszeit von IgE beträgt im Serum nur 2,5 Tage, doch bleiben die Mastzellen nach einem Serumkontakt mit IgE bis zu 12 Wochen sensibilisiert (WALDMANN et al., 1976). Die Bildung des IgE unterliegt der Kontrolle von T-Zellen. So zeigten Tiere, die mit dem Antigen Dinitrophenol (DNP) immunisiert worden waren, bis zum 10. Tag einen Anstieg der IgE-Titer. In den darauffolgenden sechs Wochen sanken die Werte wieder auf das Ausgangsniveau (POTTER et al. 1995). Mastzellen, die den hochaffinen FcεRI-Rezeptor an ihrer Membran exprimieren, können IgE binden und auf diesen Reiz mit der Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren reagieren (WALKER et al., 1992). Die Vermutung lag nahe, dass bronchokonstriktorische Reaktionen beim Asthma durch Interaktionen zwischen den Immunkomplexen und Fcε-Rezeptoren hervorgerufen werden. WILLIAMS et al. (1992) konnten zeigen, dass der FcεRII (CD23) auf alveolaren Makrophagen und auf zirkulierenden B-Lymphozyten von Asthmatikern stärker exprimiert war als auf Zellen von gesunden Individuen. Die Behandlung von bronchialen Muskelzellen mit Serum von Asthmatikern führte zur Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL-1β) und zu deren Kontraktion (HAKONARSON et al., 1995). Dass jedoch IgE nicht allein für die Übertragung der Hypersensibilität verantwortlich gemacht werden konnte, ergab sich aus Versuchen von WATSON et al. (1998). In diesen Versuchen wurden bronchiale Muskelzellen mit Serum von Asthmatikern behandelt und anschließend Histamin hinzugefügt. Es zeigte sich, dass die sensibilisierten Zellen stärker auf Histamin reagierten als die Kontrollzellen. Da im Serum jedoch kein Anti-Histamin-IgE vorhanden war, konnte diese Reaktion als IgE-unabhängige nicht spezifische Hypersensitivität betrachtet werden. Vielmehr mußten andere Faktoren im Serum für diese Reaktion verantwortlich gemacht werden, so zum Beispiel TNFα, IL-1β (HAKONARSON et al., 1996) und Mastzelltryptase (JOHNSON et al., 1997). Die Histamin-Hypersensibilität steht in Abhängigkeit vom totalen IgE-Titer (WATSON et al., 1997). Doch

konnten noch keine synergistischen Interaktionen zwischen totalem IgE und den Serumfaktoren geschlossen werden (BURROWS et al., 1989). So kann die Reaktion, die für die nicht-spezifische Histamin-Hypersensibilität verantwortlich ist, auch zu einem Anstieg des totalen IgE führen (WATSON et al., 1998). Dass Substanzen eine Sensibilisierung induzieren können, hängt vor allem mit ihrer chemischen Struktur zusammen. So konnte nachgewiesen werden, dass niedermolekulare chemische Substanzen, die eine „-N=C=O“-Gruppe beinhalten (z.B. TDI), in der Lage sind, eine allergische Sensibilisierung des Respirationstrakts hervorzurufen (CHAN-YEUNG und MALO, 1994). TDI, das in eigenen Versuchen der passiven Sensibilisierung Verwendung fand, wird im Häuserbau als Bestandteil von Montageschäumen verwendet. Bei 5-10 % der Menschen, die berufsbedingt mit TDI arbeiten, wird berufsbedingtes Asthma diagnostiziert (SCHEERENS et al., 1999). Diese Patienten zeigten klinische Symptome und Granulozytenakkumulation in den Luftwegen. Außerdem konnte bei 10 bis 20 % dieser sensibilisierten Arbeiter ein erhöhter TDI-spezifischer IgE-Titer nachgewiesen werden (SCHEERENS et al., 1996). Da TDI zur Gruppe der niedermolekularen Antigene zu rechnen ist, ist es unwahrscheinlich, dass reines TDI das Zielantigen der T-Zellen darstellt. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass inhaliertes TDI mit seinen hochreaktiven Isocyanat-Gruppen kovalente Bindungen mit körpereigenen Proteinen eingeht (KENNEDY et al., 1989). Der wiederholte Kontakt mit dem TDI-Proteinkomplex führt zu einem Anstieg von IgE und IgG im Blutserum (KAROL et al., 1995). Dabei ist offenbar entscheidend, über welchen Zeitraum und in welcher Frequenz die Exposition mit TDI erfolgt (SCHEERENS et al., 1996). So wird zwischen der kurzzeitigen und der langzeitigen Behandlung unterschieden. Eine kurzzeitige Behandlung erstreckt sich über zwei aufeinanderfolgende Tage, an denen TDI (1 %) zweimal epikutan aufgetragen wird. Dagegen nimmt die langzeitige Behandlung einen Zeitraum von sechs Wochen ein. Dabei wird einmal in der Woche eine einmalige Behandlung der Mäuse mit TDI (1 %) durchgeführt (SCHEERENS et al., 1999).

Die kurzzeitige Sensibilisierung löst keinen Anstieg der IgE-Antikörperproduktion in Folge der TDI-Behandlung aus. Es zeigt sich jedoch 24 Stunden nach dem Kontakt mit TDI eine nichtspezifische tracheale Hyperreaktivität. Durch die Übertragung von T-Lymphozyten von sensibilisierten Mäusen auf nicht sensibilisierte Empfängertiere, kann auch in diesen eine Hyperreaktivität induziert werden. Diese Tatsache gibt einen Hinweis darauf, dass es sich hier um eine DTH-Reaktion handelt (BUCKLEY und NIJKAMP, 1994).

Dieser Allergietyp ist durch das Auftreten von T_H1 -Zellen charakterisiert, was nicht zu einer gesteigerten Bildung von IgE führt. Während TDI-spezifisches IgE nicht vermehrt gebildet wird, ist ein Anstieg von TDI-spezifischem IgG nach der kurzzeitigen Sensibilisierung meßbar (SCHEERENS et al., 1999). KITAGAKI et al. (1995) konnten durch mehrmalige Applikation eines Kontaktallergens eine Verschiebung von einer DTH-Reaktion zu einer Sofort-Typ-Reaktion induzieren, der eine Spätphasenreaktion 24 Stunden nach Antigenbehandlung folgte. Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass die kurzzeitige Sensibilisierung der Mäuse mit TDI zu einer IgE-unabhängigen DTH-Reaktion führt, während eine langzeitige Sensibilisierung eine IgE-abhängige Sofortreaktion induziert (SCHEERENS et al., 1999).

Die Mäuse, deren Plasma in eigenen Untersuchungen für die passive Sensibilisierung verwendet wurde, wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Antigen TDI behandelt (GAD et al., 1986). Damit stellt das verwendete Sensibilisierungsschema einen Kompromiss zwischen den von SCHEERENS et al. (1999) beschriebenen kurz- und langfristigen Sensibilisierungsmethoden dar.

Alle bisher beschriebenen *In-vitro*-Versuche zur passiven Sensibilisierung (BÈCHEREL et al. 1994) (RABE et al. 1998) wurden mit Zellen durchgeführt, die IgE-bindende Rezeptoren ausbilden. In der Haut sind Langerhans-Zellen in der Lage den hochaffinen IgE Rezeptor (FcεR1) auszubilden. Auf Keratinozyten wurde dieser hoch affine IgE-bindende Rezeptor im Gegensatz zum niedrigaffinen FcεRII (BÈCHEREL et al., 1994) nicht beschrieben. Die Expression des niedrig-affinen Rezeptors für IgE (FcεRII oder CD23) wird bei vielen Zellen durch IL-4 gesteigert (DELESPESE et al., 1991). Dies konnten BÈCHEREL et al. (1991) auch für Keratinozyten nachweisen. In den Versuchen von BÈCHEREL et al., (1991) wurden primäre humane Keratinozyten durch Inkubation mit IL-4 zur Ausbildung des FcεRII angeregt. Nachgewiesen wurde der Rezeptor durch *in-situ*-Hybridisierung und durch Verwendung eines FcεRII-Antikörpers (BÈCHEREL et al., 1994).

Der FcεRII-Rezeptor ist ein 45 kD großes Protein, das zu den C-Typ Lektinen zu zählen ist. Mit seinem Carboxylende ist der Rezeptor in der Membran verankert (CONRAD, 1990). Die Affinität des Rezeptors zu IgE ist geringer als die des FcεRI (DELESPESE et al., 1991).

Zwei unterschiedliche Formen des FcεRII sind bis jetzt nachgewiesen. Die Unterschiede entstehen durch verschiedene Translationsstartpunkte und alternatives Splicing der mRNA von demselben Gen. Eine Variante FcεRIIA ist B-Zell-spezifisch und wird konstitutiv ausgebildet. Die zweite Form (FcεRIIB oder CD23) wird auf der Oberfläche von B-Zellen, Monozyten und eosinophilen Granulozyten durch IL-4 exprimiert (KATIRA et al., 1993). FcεRII besitzt eine C-Typ-Lektindomäne, die als Bindungsstelle für IgE fungiert (BEAVIL et al., 1992). Die proteolytische Spaltung des membrangebundenen FcεRII ergibt ein lösliches Produkt mit einer Größe von 37 kD, das weiter zu 33, 25 und 12 kD großen Fragmenten abgebaut werden kann (SARFATI et al., 1987). Das lösliche FcεRII (sCD23) ist ebenfalls in der Lage, IgE zu binden und scheint daher eine Funktion in der Regulation der IgE-Synthese zu besitzen. Damit spielt sCD23 eine wichtige Rolle während allergischer Reaktionen (RICHARDS und KATZ, 1991). Es gibt verschiedene Aufgaben, die CD23 und seine lösliche Form sCD23 wahrnehmen. So wird eine Immunität gegen Parasiten durch die Markierung der eingedrungenen Mikroorganismen mit IgE gewährleistet. Makrophagen und eosinophile Granulozyten, die den FcεRII an ihrer Membran exprimieren, erkennen den Fremdkörper und eliminieren ihn durch Phagozytose (CONRAD, 1990). sCD23 ist ein autokriner B-Zell-Wachstumsfaktor, der auch die IgE-Synthese anregt. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass bei Atopikern und Asthmatikern erhöhte sCD23-Titer gemessen werden konnten (DELESPESE et al., 1988).

Durch Behandlung von IL-4-stimulierten Keratinozyten mit humanen IgE/anti-IgE-Immunkomplexen konnten BÈCHEREL et al. (1997) im Zellkulturüberstand TNFα und Stickstoffmonoxid nachweisen. Gestützt auf diese Ergebnisse wurden für die Bearbeitung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit ebenfalls Keratinozyten verwendet. Da das Plasma von sensibilisierten Mäusen gewonnen wurde, wurden für die *In-vitro*-Versuche murine Keratinozyten verwendet. Zunächst sollten die Ergebnisse von BÈCHEREL hinsichtlich der Expression des FcεRII bestätigt werden. Dazu wurden MSC-P5-Zellen mit unterschiedlichen IL-4-Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der mRNA für FcεRII mit Hilfe der RT-PCR, sowie des Proteins durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers. Das Ergebnis der RT-PCR deutete darauf hin, dass die MSC-P5-Zellen diesen Rezeptor bereits konstitutiv ausbilden (Abb. 14). Durch Stimulation mit IL-4 war keine vermehrte Bildung von FcεRII-

mRNA festzustellen. Dieses Ergebnis kann damit erklärt werden, dass die Expression des Rezeptors posttranslational reguliert wird. Jedoch zeigten die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen mit einem fluoreszierenden Antikörper FcεRII nachgewiesen werden sollte, keinen stimulierenden Effekt von IL-4 auf die Expression des niedrig-affinen IgE-Rezeptors (Abb. 15). Bei der durchflußzytometrischen Bestimmung deutete sich eine konstitutive Ausbildung des FcεRII ebenfalls an (Abb. 16). Die Ergebnisse von BÈCHEREL et al. (1991) hinsichtlich der IL-4-abhängigen Expression des FcεRII konnten für MSC-P5-Zellen somit nicht reproduziert werden. Dies läßt sich eventuell damit erklären, dass die permanente Keratinozytenzelllinie MSC-P5 keine primären Zellen darstellen. BÈCHEREL et al. (1991) hatten ihre Versuche ausschließlich an primären humanen Keratinozyten durchgeführt.

Neben dem FcεRI und dem FcεRII besitzt auch Galektin-3 IgE bindende Funktion. Dieses IgE-bindende Protein (ε-BP) ist ein beta-galaktosid-bindendes Lektin, das äquivalent zum carbohydratebindenden Protein (CBP 35) ist. Es konnte gezeigt werden, dass das IgE-bindende Protein mit dem auf der Zelloberfläche von Makrophagen anzutreffenden Protein Mac-2 identisch ist (NABARRA und PAPIERNIK, 1988). Das Molekül ε-BP kann in zwei Einheiten unterteilt werden. Der erste Bereich beinhaltet das Aminoende mit hoch konservierten repetitiven Sequenzen, während das Carboxylende Sequenzen enthält, die für S-Typ Selektine charakteristisch sind (ROBERTSON et al., 1990). Immunhistochemische Untersuchungen an menschlicher Haut haben ergeben, dass das Zytoplasma von Keratinozyten eine anti-ε-BP-Aktivität zeigt. Das Protein wird von Keratinozyten gebildet und sezerniert, um anschließend über Kohlenhydrate an die Oberfläche von Langerhans-Zellen gebunden zu werden (HOLIKOVA et al., 2000). Es ist bekannt, dass das Lektin speziell terminale beta-Galaktosereste bindet, die in komplexen Oligosaccharidketten vorhanden sind. Nur Glukosaccharide, die eine bestimmte posttranslationale Prozessierung durchlaufen, erhalten das Glykosylierungsmuster, das die Bindung von ε-BP ermöglicht. Die Heterogenität der Bindung von IgE an ε-BP ist außerdem auf den unterschiedlichen Sialinisierungsgrad zurückzuführen (WOLLENBERG et al., 1993). Immunhistochemische Untersuchungen von humaner Haut ergaben, dass der Differenzierungsgrad der Keratinozyten die Bildung und die Freisetzung von Galektin-3 beeinflusst. So bilden Keratinozyten in Tumorgewebe Galektin-3 (KONSTANTINOV et al., 1994). Es konnte belegt werden, dass Keratinozyten

zwar das IgE-bindende Protein Galektin-3 freisetzen, jedoch war bisher nur die Bindung dieses Proteins an Langerhans-Zellen bekannt (WOLLENBERG et al., 1993).

Indem MSC-P5-Zellen zusätzlich zur passiven Sensibilisierung mit Laktose behandelt wurden, sollte ein Hinweis auf die Beteiligung von Galektin-3 an der immunologischen Reaktion untersucht werden. Laktose sollte dabei als Ligand von Galektin-3 die Bindung von IgE verhindern (SANO et al., 2000) und somit die Freisetzung von TNF α als Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung reduzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass Laktose einen hemmenden Effekt auf die Freisetzung von TNF α ausübt (Abb. 20). Um einen zytotoxischen Einfluß von Laktose ausschließen zu können, wurde gleichzeitig zur Zytokinmessung die Zellvitalität bestimmt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Keratinozyten über die Bindung von Galektin-3 in der Lage sind IgE zu binden. Da Laktose die Freisetzung von TNF α während der passiven Sensibilisierung hemmt, liegt die Vermutung nahe, dass Galektin-3 an der keratinozyten-vermittelten Reaktion beteiligt ist. Zur Absicherung müssen jedoch noch weitere Studien durchgeführt werden.

Wie Ergebnisse von SCHEERENS et al. (1999) belegen, wird neben IgE auch TDI-spezifisches IgG infolge des für die eigene Arbeit gewählten Sensibilisierungsschemas gebildet. Immun-globulin G wird als Monomer sezerniert. Es stellt den Hauptanteil der im Serum und in der interstitiellen Flüssigkeit vorliegenden Immunglobuline dar (ABBAS et al., 1997). Mononukleäre Phagozyten und neutrophile Granulozyten bilden Rezeptoren für den Fc-Teil aller IgG-Isotypen aus (ZELLER, 1993). Dabei enthalten diese Fc-Rezeptoren immunglobulinähnliche Domänen. Sie werden deshalb auch der Ig-Superfamilie zugeordnet. Wenn antigentragende IgG-Moleküle an diese Fc γ -Rezeptoren binden, wird eine Opsonierung eingeleitet. Damit wird die Phagozytose der Antigene gefördert. Alle IgG-Klassen können als Opsonine wirken (ABBAS et al., 1997). Rezeptoren für den Fc-Teil der IgG-Moleküle finden sich auf allen immunkompetenten Zellen. Sie sind für Endozytose, Phagozytose und zellvermittelter Zytotoxizität von Bedeutung (ANDERSON und LOONEY, 1986). Es konnten drei unterschiedliche Rezeptoren identifiziert werden. Der hochaffine Rezeptor Fc γ RI (72 kD) ist in großer Dichte an der Membran von Makrophagen und Monozyten nachzuweisen. Der 40 kD große Fc γ RII und der 50-70 kD große Fc γ RIII sind niedrig-affine Rezeptoren, die antigengebundenes IgG binden (MELLMAN, 1988).

Dass die Bindung von IgG Reaktionen in epidermalen Zellen induzieren kann, konnte schon an Meerschweinchenhaut nachgewiesen werden. Wurde die Haut von Meerschweinchen mit IgG behandelt, induzierte der Kontakt eine Vakuolenbildung in epidermalen Zellen (MOORE und DANNENBERG, 1992). Das Phänomen der Vakuolenbildung ließ sich auch in eigenen Versuchen an der Zellmembran von MSC-P5-Zellen beobachten, die mit sensibilisiertem Mäuseplasma behandelt wurden.

Um eine mögliche Beteiligung von IgG an der passiven Sensibilisierung einbeziehen zu können, erfolgte zunächst der Nachweis der Rezeptoren zur Bindung dieses Immunglobulins auf MSC-P5-Zellen. Bei Mäusen sind drei Fc γ R-Familien bekannt, die mit IgG-Immunkomplexen reagieren können. Der hoch-affine Fc γ RI und der niedrig-affine Fc γ RIII besitzen jeweils α - und β -Ketten mit einer tyrosinaktivierenden Sequenz, die für die Stimulation von immunologischen Reaktionen verantwortlich gemacht wird (HULETT und HOGARTH, 1994). Dagegen besitzt der Fc γ RII inhibitorische Funktion (DAERON et al., 1995). Dass IgG eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen von Mäusen einnimmt, wurde auch in *In-vivo*-Versuchen von CLYNES et al. (1999) bestätigt. Fc γ RIIb-„knock-out“-Mäuse zeigten verstärkt allergische Reaktionen, während Mutanten mit fehlenden Fc γ RI und Fc γ RIII keine pathologischen Reaktionen in Folge des Auftretens von IgG-Immunkomplexen zeigten (BOLLAND und RAVETCH, 1999). In eigenen Untersuchungen sollte mit einem fluoreszenzgekoppelten IgG-Antikörper Fc γ R für MSC-P5-Zellen nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zellen mit IgG1 als Immunkomplex sowie als reines Immunglobulin ergab, dass die verwendeten Keratinozyten in der Lage waren freies IgG zu binden (Abb. 17). Jedoch konnte diese Bindung durch Vorbehandlung der Zellen mit IL-4 nicht gesteigert werden (Abb. 19). Auf die Expression von Fc γ RII und Fc γ RIII bei murinen eosinophilen Granulozyten hatte IL-4 in Versuchen von de ANDRES et al. (1994) keinen Einfluß. Deswegen wurde auf Versuche, die den Einfluß von IL-4 auf die Expression dieser niedrig-affinen Rezeptoren bei murinen Keratinozyten untersuchen sollten, verzichtet. In einem weiteren Versuch wurde IgG im Plasma von TDI-sensibilisierten Mäusen indirekt nachgewiesen (Abb. 18). Der für diese Untersuchungen eingesetzte IgG-Antikörper erkannte das an Keratinozyten gebundene IgG. Die Versuche zeigten, dass der Immunkomplex aus IgG und dem Antigen TDI in der Lage war, an die Zellen zu binden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, in denen reines IgG1 eingesetzt wurde. Hier

wurde nur nicht komplexiertes Immunglobulin nachgewiesen. Somit liegt die Schlußfolgerung nahe, dass im sensibilisierten Mäuseplasma neben IgG1 auch IgG-Subklassen mit einer niedrigen Affinität gegenüber den Fc γ -Rezeptoren enthalten sind. Diese Globuline werden nur als Immunkomplex gebunden.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass MSC-P5-Zellen den Fc γ RI konstitutiv ausbilden, dass jedoch dessen Expression durch IL-4 nicht erhöht wird. Außerdem sind niedrig-affine Rezeptoren für IgG vorhanden. Diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung auch *in vivo*. In normaler humaner Haut konnten für Keratinozyten Fc γ RI und Fc γ RIII nachgewiesen werden (TIGALONOWA et al., 1991). Die oben beschriebenen Ergebnisse der Nachweise von immunglobulinbindenden Rezeptoren belegen, dass auch IgG während der passiven Sensibilisierung muriner Keratinozyten eine Rolle spielt.

5.2 Einfluß von IL-4 auf die passive Sensibilisierung

Auch wenn IL-4 weder die Fc ϵ RII- noch die Fc γ RI-Dichte erhöhte, so führte eine Vorinkubation mit diesem Zytokin dennoch zu einer verstärkten Antwort der MSC-P5-Zellen auf die passive Sensibilisierung. Damit IL-4 einen Einfluß auf Keratinozyten ausüben kann, muß der entsprechende Rezeptor auf Keratinozyten vorhanden sein. JUNGHANS et al. (1996) konnten für humane Keratinozyten die Existenz des IL-4-Rezeptors belegen. Dies wurde von ALBANESI et al. (2000a) sowie von LARCHE und RITTER (1989) bestätigt. In der Haut von Atopikern ist der Rezeptor auf basalen Keratinozyten besonders häufig (JUNGHANS et al., 1996).

Interleukin-4 (IL-4) wurde ursprünglich als Zytokin beschrieben, das von T-Helfer-Zellen gebildet wird. Es hat eine Größe um 20 kD und stimuliert die Proliferation von B-Zellen. Die Hauptfunktion von IL-4 besteht jedoch in der Regulierung der IgE- und Mastzell/Granulozyt-vermittelten Immunreaktionen (ABBAS et al., 1997).

Eine wichtige Funktion von IL-4 ist die Induktion des Antikörper-Isotyp-Wechsels in B-Zellen bei der IgE-Produktion (VERCELLI et al., 1993). Aus diesem Grund fehlt IL-4 „*knock-out*“-Mäusen die Fähigkeit zur Produktion von IgE.

Werden Keratinozyten durch Kontaktallergene oder durch Zytokine stimuliert, können sie verschiedene lösliche Membranmediatoren freisetzen, die zur Anlockung und Stimulation von T-Zellen und anderer Leukozyten führen. Bei der atopischen Dermatitis setzen T-Zellen (hauptsächlich CD4⁺-Zellen) IL-4 frei (SALERNO et al., 1995). Das freigesetzte IL-4 bindet an Keratinozyten und führt zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (ALBANESI et al., 2000b).

Auch *in vitro* konnte der stimulierende Effekt von IL-4 auf Keratinozyten gezeigt werden. So führte eine zusätzlich zu einem LPS-Reiz durchgeführte IL-4 Behandlung von Keratinozyten zu einer gesteigerten Freisetzung bestimmter Chemokine. Zu diesen Chemokinen zählten IFN γ , IP-10 (IFN-induced protein), Mig (monokine induced by IFN γ) und I-Tac (IFN-inducible T-cell α -chemoattractant (ALBANESI et al., 2000b). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Reaktion von Keratinozyten auf die Bindung von inflammatorischen Zytokinen oder Antigenen durch die simultane Inkubation mit IL-4 amplifiziert werden kann (ALBANESI et al., 2000a). In eigenen Versuchen hatte IL-4 einen verstärkenden Effekt auf die immunglobulininduzierte Reaktion der Keratinozyten während der passiven Sensibilisierung. Während nicht IL-4-stimulierte Keratinozyten nicht mit einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Abb. 22) und TNF α (Abb. 24) auf die Sensibilisierung reagierten, setzten MSC-P5-Zellen, die IL-4-vorbehandelt waren, signifikant größere Mengen dieser proinflammatorischen Mediatoren frei (Abb. 23 u. 25). Die Annahme, dass diese Reaktion durch die vermehrte Expression der immunglobulinbindenden Rezeptoren hervorgerufen wurde, konnte bereits widerlegt werden. Vielmehr scheint IL-4 unabhängig von der Expression der Fc-Rezeptoren die Bildung der Botenstoffe zu beeinflussen. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass IL-4 auch alleine Reaktionen in Keratinozyten hervorrufen kann. Keratinozyten reagieren auf die Inkubation mit IL-4 mit einer gesteigerten Proliferation und sie bilden verstärkt sogenannte B7/BB1-Proteine, die Kostimulatoren der MHC-Klasse 2-vermittelten T-Zell-Induktion sind (OTTEN et al., 1988).

5.3 Freisetzung von NO als Reaktion auf die passive Sensibilisierung

Der erste Parameter, mit dem die Reaktion der Keratinozyten auf die passive Sensibilisierung untersucht wurde, war die Freisetzung von Stickstoffmonoxid. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochreaktives freies Radikal, das von vielen Zelltypen, unter anderem auch Keratinozyten, produziert wird. Neben anderen Funktionen ist das Radikal ein wichtiger Mediator allergischer Reaktionen (BILLAR et al., 1992).

Werden Makrophagen mit LPS und IFN γ inkubiert, reagieren sie mit der Freisetzung von Stickstoffmonoxid. Durch diese Manipulation wird die Stickstoffmonoxidsynthase aktiviert. Während inflammatorischer Reaktionen wirkt NO vasodilatatorisch. Dadurch wird der lokale Blutstrom verstärkt und der Eintritt von Leukozyten in das Gewebe erleichtert (ABBAS et al., 1997).

Die Aktivierung von Keratinozyten durch IgE/Antigen-Komplexe führt zur Stimulation der NO-Bildung. Dies geht einher mit der Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF α , IL-6) (BÈCHEREL et al., 1994). Die TNF α -Bildung steht im direkten Zusammenhang mit der NO-Freisetzung, was durch den Einsatz von NO-Synthase-Aktivatoren oder -Inhibitoren bewiesen werden konnte. So führte die Behandlung der Zellen mit Natriumnitroprussit (NO-Donor) zur Steigerung der TNF α -Bildung, während der Einsatz von Mono-methyl-L-Arginin (NO-Inhibitor) die TNF α -Synthese hemmte. Ligation von Fc ϵ RII (CD23) führt zur Akkumulation von zyklischen Nukleotiden (cGMP und cAMP), die an der NO-Bildung beteiligt sind (BÈCHEREL et al., 1994a). Eine Inhibition des cAMP-Reaktionsweges bewirkt eine Hemmung der TNF α - und IL-10 Synthese nach Fc ϵ RII Ligation, während die Hemmung des NO-Reaktionsweges keine Auswirkung auf die IL-10 Bildung hatte (BÈCHEREL et al., 1997).

In Überständen von Keratinozyten, die nach IL-4-Vorbehandlung durch die Inkubation mit sensibilisiertem Mäuseplasma sensibilisiert und zusätzlich mit dem Antigen TDI behandelt wurden, konnte eine signifikant höhere NO-Konzentration als in den Kontrollgruppen bestimmt werden (Abb. 23). Somit konnten die Ergebnisse von BÈCHEREL et al. (1994) bestätigt werden. Da es, wie oben erwähnt, Hinweise gab, dass die Stimulation der NO-

Synthese auch eine Voraussetzung für die Bildung und Freisetzung von TNF α darstellt, sollte ebenfalls dieses proinflammatorische Protein bestimmt werden.

5.4 Freisetzung von TNF α als Reaktion auf die passive Sensibilisierung

Ursprünglich wurde TNF α als ein endotoxin-induzierter Faktor beschrieben, der von Makrophagen sezerniert wird (CARSWELL et al., 1975). TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das z.B. in der Pathogenese vieler pulmonaler Entzündungen wie Asthma und chronischer Bronchitis eine bedeutende Rolle einnimmt (STRIETER et al., 1993). TNF α ist ein pleiotropes Zytokin, welches zelluläre Proliferation, Differenzierung und Immunregulation beeinflusst (VASSALLI, 1992). Es wird als nichtglykosyliertes Transmembranprotein mit einer Größe von 25 kD gebildet, das sich aus Homotrimeren zusammensetzt. Ein 17 kD Fragment jeder Untereinheit vom Carboxylende kann von der Plasmamembran abgespalten werden (GRAMAGLIA et al., 1999). Diese drei abgespaltenen Untereinheiten bilden ein stabiles Homotrimer (51 kD), das von den Zellen sezerniert wird. Die TNF α -Wirkung wird durch die Bindung an den TNF-Rezeptor (TNF-R) vermittelt. Etwa 500 bis 10000 hoch-affine Rezeptoren für TNF α sind auf allen somatischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert. Es existieren zwei Rezeptortypen mit einer Größe von 55 kD (TNF-RI) und 75 kD (TNF-RII) (ABBAS et al. 1997). Da die Bindungsaffinität für TNF α an die Rezeptoren für ein Zytokin relativ gering sind ($K_d=10^{-9}$ für TNF-RI, $K_d=5*10^{-10}$ für TNF-RII), muß TNF α in sehr großen Mengen freigesetzt werden, um eine Wirkung in Zielzellen auszulösen (TARTAGLIA et al., 1993). Beide Rezeptorarten werden von Zellen exprimiert, wobei die stärkeren Effekte durch Ligation des TNF-RI vermittelt werden. TNF-RII dagegen bindet membranständiges TNF α und transportiert lösliches TNF α zum TNF-RI. TNF α -aktivierte Zellen verlieren ihre TNF-Rezeptoren, die dann als lösliche Rezeptoren die membrangebundenen kompetitiv hemmen (ROMERO et al., 2000). Lösliche TNF-Rezeptoren bewirken einen negativen Rückkopplungseffekt, indem sie freies TNF α binden und damit die Ligation an Zielzellen verhindern. Viele Antworten auf einen TNF-Reiz bewirken eine gesteigerte Transkriptionsrate bestimmter Zielgene. Die gesteigerte Transkriptionsaktivität wird durch Aktivierung von NF κ B (nuclear factor kappa B) und AP-1 (activator protein 1) vermittelt. Der Transkriptionsfaktor NF κ B bildet im nicht-aktivierten Zustand im Zytosol einen Komplex mit seinem Inhibitor (BALDWIN, 1996).

Nach TNF α -Behandlung wird NF κ B demaskiert und gelangt in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen aktiviert (BAEUERLE, 1998). AP-1 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der normalerweise als Homo- oder Heterodimer von Jun, Fos und dem ATF (activation transcription factor) vorliegt (KARIN et al., 1997). In Endothelzellen induziert TNF α die Bildung eines c-Jun/ATF-Komplexes (DE LUCA et al., 1994), der eine essentielle Voraussetzung zur Induktion des leukozytenbindenden Proteins E-Selektin darstellt. In ATF-„knock out“ Mäusen ist die Induktion von E-Selektin durch TNF α nicht möglich (REIMHOLD et al., 1996). Die Aktivität von AP-1 kann sowohl durch die Induktion (c-Fos) als auch durch Phosphorylierung der N-terminalen Domäne durch MAP (mitogen activated protein) reguliert werden (ROULSTON et al., 1998).

Die biologische Wirkung von TNF α ist konzentrationsabhängig. In niedriger Konzentration wirkt es als autokriner und parakriner Regulator für Leukozyten und Endothelzellen. Letztere werden zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen stimuliert, so dass die Zelloberfläche eine bessere Anheftungsmöglichkeit für Leukozyten bietet (VERDEGAAL et al., 1996). In größerer Konzentration induziert TNF α im Zusammenspiel mit IL-1 β die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis zu den Lymphknoten (CUMBERBATCH et al., 1996). Mononukleäre Phagozyten und Endothelzellen werden durch höhere TNF α -Konzentrationen zur Produktion von IL-1 β und IL-6 angeregt (CHI et al., 2001). Für humane Keratinozyten gilt die Abhängigkeit der TNF α -Synthese von der Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (BÈCHEREL et al. 1996). Dabei scheint TNF α die TNF α -Synthese selbst in Form eines Auto-Amplifikationsprozesses zu steigern. PIGUET et al. (1991) vermuten, dass die Kapazität der Keratinozyten zur TNF α -Produktion ein limitierender Faktor der Hautreaktion auf einen Antigenreiz ist (PIGUET et al., 1991).

Vorliegende Untersuchungen zur Induktion von TNF α zeigen, dass drei Stunden nach Behandlung der Keratinozyten mit Kontaktallergenen ein deutliches Maximum der mRNA-Expression meßbar ist (WILMER et al., 1994). In Versuchen an künstlichen humanen Hautäquivalenten (EPISKINTM), fanden CORSINI et al. (1997) 48 Stunden nach Behandlung mit dem Kontaktallergen **D**initrochlorobenzen (DNCB) eine erhöhte TNF α -Freisetzung.

Auch auf die passive Sensibilisierung und anschließende Inkubation mit TDI reagierten Keratinozyten mit signifikant gesteigerter Freisetzung von TNF α . Es zeigte sich in Analogie zur NO-Messung, dass die Vorbehandlung der Zellen mit IL-4 essentiell war (Abb. 24 u. 25). Durch den Nachweis der mRNA für TNF α konnte belegt werden, dass der Freisetzung des Zytokins eine Neusynthese zugrunde lag (Abb. 26). Dies wurde durch Versuche von CORINI et al. (1997) bestätigt, in denen BALB/c Mäuse durch die Behandlung mit dem Hautirritans Tributyltin (TBT) zur Synthese von TNF α stimuliert wurden. In diesen Versuchen konnte schon eine Stunde nach der Behandlung der Mäuse mit TBT ein Anstieg der mRNA für TNF α in der behandelten Mäusehaut nachgewiesen werden. Nach vier Stunden war die TNF α -mRNA-Menge am größten. Dies stimmt auch mit dem eigenen Ergebnis des Nachweises der TNF α -mRNA überein. In den Kontrollgruppen war keine mRNA für TNF α nachzuweisen. Direkt nach der Behandlung mit dem Antigen setzte in passiv sensibilisierten Keratinozyten die Bildung der mRNA für TNF α ein. Daran schloß sich die Proteinbiosynthese des Zytokins an. So war in diesen Zellen vier Stunden nach der Antigenbehandlung eine Zunahme der intrazellulären TNF α -Konzentration nachzuweisen (Abb. 27). In Zellen, die 24 Stunden nach der TDI-Behandlung lysiert wurden, konnte keine erhöhte TNF α -Menge mehr gemessen werden. Dies spricht dafür, dass das intrazelluläre TNF α in die extrazelluläre Umgebung (Medium) abgegeben wurde. Binnen acht Stunden war ein Anstieg der extrazellulären TNF α -Menge nachzuweisen (Abb. 33). Im Zellkulturüberstand wurde die maximale TNF α -Menge 24 Stunden nach der TDI-Behandlung der Keratinozyten gemessen. Danach folgte keine weitere Akkumulation des Zytokins im Medium, da die Synthese eingestellt wurde.

5.5 Freisetzung von IL-1 β als Reaktion auf die passive Sensibilisierung

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist IL-1 β . Nachdem gezeigt werden konnte, dass passiv sensibilisierte Keratinozyten mit der Bildung und Freisetzung von TNF α reagierten, sollte auch IL-1 β im Überstand dieser Zellen analysiert werden. Anfänglich wurde IL-1 als Kostimulator für T-Zellen beschrieben, das von mononukleären Phagozyten sezerniert wird. Inzwischen hat sich gezeigt, dass IL-1 ähnlich wie TNF α eine zentrale Rolle in der Frühphase der allergischen Reaktion besitzt. Zu den Zellen, die IL-1 sezernieren

können, gehören Monozyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und einige Tumorzellen (DINARELLO, 1998). IL-1 wird in zwei unterschiedlichen α - und β -Formen hergestellt. Beide Formen haben eine Größe von 17 kD, doch besitzen sie lediglich eine Homologie von 30 %. Trotz dieser strukturellen Unterschiede binden beide Polypeptide an den gleichen Rezeptor und ihre biologische Aktivität ist identisch. Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β werden als 33 kD große Precursor-Proteine synthetisiert, doch während die α -Form selbst schon biologisch aktiv ist, muß zur Aktivierung des β -Proteins das Precursorprotein zur 17 kD großen Form proteolytisch gespalten werden (KUPPER und GROVES, 1995). Diese Spaltung wird von dem Interleukin-1 β converting enzyme (ICE) katalysiert. IL-1 α erscheint entweder intrazellulär oder in einer membrangebundenen Form. Das Fehlen einer hydrophoben Anfangssequenz, die für die Migration durch die Membran verantwortlich ist, bedeutet für IL-1 α , dass einer Sekretion eine Membranschädigung vorangehen muß (DINARELLO, 1998). Während die IL-1 α mRNA-Transkription weder durch irritierende Substanzen noch durch Antigene gesteigert wird, ist drei Stunden nach einem Kontakt der Haut mit einem Antigen ein Auftreten von IL-1 β mRNA meßbar (MATSUNGA et al., 1998). IL-1 β induziert im Zusammenspiel mit TNF α die Migration der Langerhans-Zellen aus der Epidermis in die Lymphknoten. Außerdem wirkt es chemotaktisch für Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Es stimuliert die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung verschiedenster Zelltypen (YANG et al., 2000). Darüberhinaus induziert es die Produktion von Zytokinen wie GM-CSF, IL-6 und IL-8 (PHILLIPS et al., 1995). Gleichzeitig mit der Bildung großer Mengen an IL-1 exprimieren Keratinozyten auch IL-1-Rezeptoren. Die ebenfalls gebildeten IL-1-Rezeptorantagonisten fungieren als kompetitive Inhibitoren, die die IL-1-Aktion so lange unterdrücken, bis die Konzentration an IL-1 einen Schwellenwert erreicht hat. Antagonistische Wirkung haben auch lösliche IL-1-Rezeptoren, die freigesetztes IL-1 binden (CORRADI et al., 1995). Analog zu TNF α nimmt auch IL-1 Einfluß auf die Transkription der Zielgene, dabei aktiviert das Zytokin NF κ B und AP-1 (DAS et al., 1995).

Ähnlich wie TNF α konnte auch im Überstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die zusätzlich mit TDI behandelt wurden, eine signifikant größere Menge IL-1 β als in den Kontrollgruppen nachgewiesen werden (Abb. 28). Doch im Gegensatz zu TNF α setzte die Bildung dieses Zytokins erst 24 Stunden nach der TDI-Behandlung ein (Abb. 34). Dass die

Freisetzung dieses Zytokins erst verspätet einsetzte, kann eventuell mit der Neusynthese des IL-1 β -Precursorproteins und dessen anschließende Aktivierung durch ICE, erklärt werden, da Keratinozyten dieses Enzym nicht konstitutiv bilden (ZEPTER et al., 1997). Durch irritierende oder sensibilisierende Substanzen kann ICE induziert werden (NYLANDER-LUNDQUIST et al., 1996).

5.6 Freisetzung von IL-10 als Reaktion auf die passive Sensibilisierung

Neben den beiden proinflammatorischen Zytokinen wurde mit IL-10 auch ein Suppressor immunologischer Reaktionen im Überstand passiv sensibilisierter Zellen bestimmt.

IL-10 ist ein 18 kD-großes Zytokin, das von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten und Keratinozyten gebildet wird. Keratinozyten sind die Hauptproduzenten von IL-10 in der Haut (ENK und KATZ, 1992), welches eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF α , IL-1, IL-12) zeigt (MOORE et al., 1993). In IL-10-„*knock out*“ Mäusen wurden nach LPS-Behandlung größere Mengen TNF α und IL-1 β freigesetzt, was zur Folge hatte, dass Langerhans-Zellen verstärkt aus der Epidermis in die Lymphknoten wanderten (WANG et al., 1999). Eine weitere Wirkung von IL-10 ist die Unterdrückung der MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complexes), sowie die Reduzierung der Expression von Kostimulatoren wie B7/1 und B7/2 Molekülen für die T-Zell-Aktivierung (FREI et al., 1994). Diese biologischen Effekte tragen zur Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei. Einige Viren wie das Epstein-Barr-Virus besitzen zum IL-10 homologe Gensequenzen, die zu einer Inhibition des Immunsystems führen sollen (MOORE. et al., 1994).

Im Überstand von Keratinozyten, die passiv sensibilisiert und zusätzlich mit dem Antigen TDI behandelt wurden, zeigte sich binnen 48 Stunden nach der Antigengabe keine signifikant erhöhte IL-10-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 29 u. 35). Eventuell war die Inkubationszeit mit dem Antigen zu kurz, so dass nur ein tendenzieller Anstieg von IL-10 im Medium nachgewiesen werden konnte. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von ENK und KATZ (1992). Hier reagierten kultivierte murine Keratinozyten auf einen Antigenreiz mit der Produktion von IL-10. Vier Stunden nach der Anti-

gengabe setzte eine vermehrte Produktion von IL-10-mRNA ein. Das entsprechende Protein war 18 Stunden nach der Behandlung im Kulturmedium bestimmbar (ENK und KATZ, 1992). Der Widerspruch kann eventuell dadurch erklärt werden, dass die passive Sensibilisierung eine komplexere Reaktion als die alleinige Bindung des Antigens an die Keratinozyten darstellt. Jedoch zeigten auch die Versuche von BÈCHEREL et al. (1997), dass primäre humane Keratinozyten infolge der Behandlung mit einem Antigen/IgE-Immunkomplex nach vier Stunden mit einer verstärkten Bildung von IL-10-mRNA reagierten. Im Gegensatz zu den primären Keratinozyten wurde für die passive Sensibilisierung mit Mäuseplasma eine permanente Zelllinie verwendet. Die genetisch veränderten MSC-P5-Zellen entsprechen nicht vollständig primären Zellen. Dass sich die eigenen Ergebnisse der IL-10-Messungen konträr zu den Ergebnissen von BÈCHEREL et al. (1991) darstellen, kann durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärt werden kann. So wurde bei der Sensibilisierung der humanen Keratinozyten reines IgE verwendet, während in eigenen Studien Mäuseplasma eingesetzt wurde, in dem ein Gemisch von IgE, IgG1 und IgG2 vorhanden ist.

5.7 Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung der Mäuse und Plasmagewinnung auf die passive Sensibilisierung

Versuche, die die Reproduzierbarkeit der TNF α - und IL-10-Messungen bestätigen sollten, ergaben bei einem identischen Versuchsdesign teilweise unterschiedliche Zytokinkonzentrationen. Es fiel auf, dass in der Kontrollgruppe nach passiver Sensibilisierung, in der die Keratinozyten nur mit dem sensibilisierten Mäuseplasma behandelt wurden, ein ebenso hoher Zytokingehalt gemessen wurde wie in der Gruppe der Keratinozyten, die zusätzlich zum Mäuseplasma mit TDI inkubiert wurden. Die einzige nicht standardisierte Komponente war dabei das Mäuseplasma. So wurde das Plasma zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen. Um einem Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung der Mäuse und der Entnahme von Plasma auf die Reaktion der Keratinozyten infolge der passiven Sensibilisierung zu untersuchen, wurden die Zellen mit Plasma inkubiert, das zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach TDI-Behandlung gewonnen wurde.

DEARMAN und KIMBER (1991) hatten BALB/c-Mäuse gegen das respiratorische Antigen Trimellitsdureanhydrid (TMA) sensibilisiert und zu definierten Zeitpunkten nach Antigengabe Immunglobulinspiegel gemessen. Der IgG-Titer war am achten Tag nach TMA-Applikation in sensibilisierten Mäusen deutlich erhöht. Binnen 14 Tagen stieg die IgG-Menge noch deutlich an. Der IgG-Spiegel sank 21 Tage nach der Antigenbehandlung wieder leicht ab. Für IgE ließ sich ein ähnlicher Verlauf der Immunglobulinkonzentration im Mäuseplasma nachweisen. 14 Tage nach der Antigengabe erreichte die IgE-Konzentration ihr Maximum. Nach 21 Tagen war der IgE-Spiegel wieder deutlich abgesunken. Diese Ergebnisse wurden auch in Versuchen von MANETZ und MEADE (1999) bestätigt. Hier wurden B6C3F1-Mäuse mit TDI sensibilisiert. 10 Tage nach der Antigengabe war der IgE-Titer im Plasma am größten.

Wurde zur passiven Sensibilisierung der MSC-P5-Zellen Mäuseplasma verwendet, das sieben Tage nach der TDI-Behandlung von Mäusen gewonnen wurde, war der Unterschied der freigesetzten TNF α -Menge zwischen TDI-behandelten und unbehandelten Zellen am größten (Abb. 31). Auffallend war, dass bei Verwendung von Mäuseplasma, das 21 Tage nach TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde, auch in der unbehandelten, sensibilisierten Gruppe ein hoher TNF α -Spiegel gemessen werden konnte. Da die Bindung von TNF α an seinen Rezeptor in bestimmten Zielzellen auch die Induktion von Zelltod bewirken kann (ASHKENAZI und DIXIT, 1998), lag hier vielleicht ein regulatorischer Mechanismus vor. Wenn die Immunantwort über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten wurde, wird durch die Freisetzung von TNF α Zelltod von Immunzellen ausgelöst und somit die Reaktion beendet. Der Fas-Ligand, der ebenfalls von Keratinozyten freigesetzt wird, induziert durch die Bindung an den Fas-Rezeptor Apoptose in Lymphozyten (ABBAS et al., 1997). Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte in einem identischen Versuchsaufbau anstelle von TNF α IL-1 β bestimmt werden, da IL-1 β im Gegensatz zu TNF α keine zellto-duzierende Funktion besitzt. Deshalb wurde angenommen, dass Keratinozyten, die mit Plasma sensibilisiert wurden, das später als sieben Tage nach TDI-Behandlung von Mäusen gewonnen wurde, keine vermehrte IL-1 β -Mengen freisetzen. Auch hier zeigte sich, dass durch die Verwendung von Plasma, das sieben Tage nach TDI-Behandlung von Mäusen gewonnen wurde, die Unterschiede der freigesetzten IL-1 β -Mengen zwischen den TDI-behandelten und den unbehandelten Gruppen am deutlichsten waren (Abb. 32). Wurde Plasma eingesetzt, das 21 Tage nach TDI-Behandlung der Mäuse gewonnen wurde,

dann wurde auch in der unbehandelten Gruppe eine große Menge IL-1 β freigesetzt. Dieses Ergebnis spiegelt die Resultate der TNF α -Messungen wider. Eventuell resultiert der Zytokinanstieg nach alleiniger Zugabe von Plasma aus einem veränderten Immunglobulinverhältnis innerhalb des Mäuseplasmas. DEARMAN und KIMBER (1991) konnten in Plasma von TMA-sensibilisierten Mäusen eine Abhängigkeit der vorhandenen Immunglobulinsubtypen von dem Zeitpunkt der Antigenbehandlung zeigen. In acht Tage altem Plasma war die Konzentration von IgG1 deutlich größer als von IgG2b. Sechs Tage später waren sowohl IgG1 und IgG2b stark angestiegen und die Konzentrationen der beiden Immunglobuline waren gleich. Während eine Woche später die Menge von IgG1 konstant auf dem hohen Niveau blieb, sank die Konzentration von IgG2b wieder stark ab. Da IgG2b immunsuppressiv wirkt, ist diese hemmende Komponente in 21 Tage altem Plasma weniger stark vertreten als in acht oder 14 Tage altem Plasma. Dies erklärt, dass Keratinozyten, die mit 21 Tage altem Plasma behandelt wurden, auch ohne Inkubation mit TDI große Mengen TNF α und IL-1 β freisetzen. Wahrscheinlich induziert die Bindung von IgG1 an den Fc γ RI-Rezeptor, der für MSC-P5-Zellen nachgewiesen wurde, bereits die Sekretion der Zytokine, da die immunsuppressive Wirkung von IgG2b ausbleibt.

In den Versuchen, in denen die Abhängigkeit der Keratinozytenreaktion auf die Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung der Mäuse und Plasmagewinnung untersucht werden sollte, wurde auch ein Vitalitätstest durchgeführt, um zytotoxische Effekte infolge der Behandlung ausschließen zu können. Eine Abnahme der Vitalität konnte durch die passive Sensibilisierung nicht festgestellt werden (Abb. 30). Dagegen induzierte die Verwendung von Plasma, das sechs Stunden nach TDI-Gabe von den Mäusen gewonnen wurde einen verstärkten Tetrazoliumumsatz. Dies läßt darauf schließen, dass in dem Plasma Faktoren enthalten sind, die proliferationsfördernd auf Keratinozyten wirken. Ein möglicher Faktor ist IL-6, dessen Einfluß auf die Zellteilungsaktivität von Keratinozyten von SAWAMURA et al. (1998) nachgewiesen werden konnte.

5.8 Passive Sensibilisierung mit reinem IgE

Die passive Sensibilisierung sollte durch Verwendung von reinem IgE unter standardisierteren Bedingungen durchgeführt werden, da das bisher verwendete sensibilisierte Mäuseplasma ein Gemisch aus unterschiedlichen Immunglobulinen und Zytokinen darstellt (SCHEERENS et al., 1999). Das eingesetzte reine IgE war Dinitrophenol-(DNP)-spezifisch. Der Komplex aus DNP und anti-DNP-IgE bindet an FcεRII (CHEN, 1991) und kann den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren (BAYON et al., 1998). Aus diesen Gründen wurden MSC-P5-Zellen mit einem Komplex aus DNP und anti-DNP-IgE behandelt. Die Keratinozyten waren vorher in Anlehnung an die Sensibilisierung mit Mäuseplasma mit IL-4 stimuliert worden. In Überständen, die 48 Stunden nach der Behandlung analysiert wurden, konnte keine vermehrte Bildung von TNFα nachgewiesen werden (Abb. 38 u. 39). Dies läßt darauf schließen, dass die Sensibilisierung nicht nur auf die Bindung von IgE reduziert werden kann. Vielmehr scheint ein Gemisch von IgE und IgG-Subtypen erforderlich zu sein.

5.9 Wechselwirkung zwischen Keratinozyten und Endothelzellen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass passiv sensibilisierte und antigenbehandelte Keratinozyten Stickstoffmonoxid, TNFα sowie IL-1β freisetzen, sollte der Einfluß dieser Mediatoren auf Endothelzellen untersucht werden. Da Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Umverteilung von Granulozyten, Makrophagen/Monozyten und Mastzellen während immunologisch bedingter Abwehrreaktionen der Haut spielen, wäre die Interaktion zwischen Endothelzellen und Keratinozyten ein Hinweis auf die Beteiligung von Keratinozyten am kutanen Immungeschehen. Dafür wurde der Überstand passiv sensibilisierter Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Gabe gesammelt und Endothelzellen zugefügt.

Wenn Gedächtnis-T-Zellen Kontakt mit ihrem speziellen Antigen erhalten, induzieren sie eine Veränderung von mikrovaskulären Endothelzellen (DOUKAS et al., 1990). Diese Veränderungen sollen die Umverteilung von zirkulierenden Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem in das entzündliche Gewebe bewirken (NICKOLOFF und GRIFFITHS, 1990). Durch vasodilatatorische Substanzen (Prostazyklin und NO) wird die Durchblutung gesteigert,

was zu vermehrtem Heranführen von Leukozyten führt (ABBAS et al., 1997). Die Bildung von Prostazyklin in Endothelzellen wird durch $\text{TNF}\alpha$ gesteigert. Durch die Ausbildung von Oberflächenmolekülen erlangen die Endothelzellen die Fähigkeit, Leukozyten zu binden. Einige dieser Adhäsionsmoleküle auf vaskulären Endothelzellen sind an der Induktion der antigeninduzierten Entzündung beteiligt. So wird E-Selektin ein bis zwei Stunden nach Induktion von diesen Zellen exprimiert. Dieses bewirkt die erste Anheftung von neutrophilen Granulozyten. Im Blutstrom „rollen“ die neutrophilen Granulozyten an der Oberfläche von Endothelzellen entlang. Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 wird sechs bis zwölf Stunden nach Signalinduktion exprimiert und bindet Gedächtnis-T-Zellen und andere Leukozyten, die VLA-4-Integrin an der Oberfläche besitzen. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1, welches eine ähnliche Expressionskinetik wie VCAM-1 besitzt, ist für die Wanderung von Leukozyten aus dem Blutgefäß in das betroffene Gewebe verantwortlich (BOEHME et al., 2000). Durch die unterschiedlichen Expressionszeiten der einzelnen Adhäsionsmoleküle wird die Bindung von Zellen gesteuert. Zuerst binden neutrophile Granulozyten (zwei bis sechs Stunden nach Antigenkontakt), danach folgen Lymphozyten und Monozyten (sechs bis zwölf Stunden nach Antigenkontakt). Antigen-aktivierte T-Zellen induzieren in Endothelzellen die Bildung von IL-8 und dem Monozyten-chemotaktischen-Protein-1 (MCP-1) (ABBAS et al., 1997).

Freigesetzte Zytokine von aktivierten T-Zellen induzieren morphologische Änderungen des Blutgefäßendothels, die das Durchdringen von Makromolekülen und die Extravasation von Zellen ermöglichen. Nach 24 Stunden werden die Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen neu organisiert und vor allem an interzellulären Verbindungen konzentriert. Das Entlangrollen der Lymphozyten auf der Oberfläche von Endothelzellen führt zu Aktivierung der Blutgefäßzellen (CROCKETT-TORABI, 1998). Dieser Vorgang induziert die Neugestaltung des Zytoskeletts von Leukozyten, was die Affinität der Integrine gegenüber den Endothelzellrezeptoren erhöht. Die Wanderung der Leukozyten wird schließlich verlangsamt, bis sie interendotheliale Zellverbindungen erreichen. An diesen Zellverbindungen erhalten die Zellen Signale, die die Migration der Leukozyten in das Gewebe einleiten (ALLPORT et al., 1997). Im Gewebe bewegen sich die Zellen entlang der Fibrin/Fibronectin-Matrix fort (VAN PELT et al., 1997). Die extravaskuläre Wanderung wird durch Chemokingradienten beeinflusst. Die in das Gewebe eingedrungenen Leukozyten sterben nach einigen Tagen ab (charakteristisch für neutrophile Granulozyten) (SAITOH et

al., 2000), werden aktiviert (T-Zellen und Monozyten) oder verlassen die Region wieder über Lymphgefäße. Die Steuerung dieser Vorgänge ist noch nicht näher bestimmt (ABBAS et al., 1997).

Wurden Endothelzellen mit dem Überstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten inkubiert, dann wurde nach 48 Stunden eine gesteigerte Proliferationsaktivität der Endothelzellen gemessen (Abb. 36). Stammte das Plasma von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die zusätzlich noch mit dem Antigen TDI behandelt wurden, dann vergrößerte sich die Zellteilungsaktivität nochmals. Da die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch Keratinozyten nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass NO einer der Faktoren war, der für die Zunahme der Proliferationsaktivität der Endothelzellen verantwortlich war. Weitere mögliche Mediatoren, die die Zellteilungsaktivität der Endothelzellen (bend.3-Zellen) beeinflussen können, sind Prostazyklin und VEGF (ABBAS et al., 1997). Beide Faktoren wurden jedoch nicht im Überstand der Keratinozyten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten in der Lage sind, die Proliferationsaktivität der Endothelzellen zu erhöhen. Die zweite Frage bezog sich auf die Ausbildung von Adhäsionsfaktoren. Acht Stunden nachdem der Überstand von sensibilisierten Keratinozyten zugefügt wurde, deutete sich eine gesteigerte Expression von VCAM-1 an (Abb. 37).

In vivo bildet die Basalmembran eine Diffusionsbarriere für Mediatoren, die von Keratinozyten freigesetzt werden. Epithelien lagern einer extrazellulären Basalmembran auf, die aus drei Schichten besteht. Die Lamina lucida liegt unter der basalen Plasmamembran und besteht aus Glykoproteinen. Auf diese Schicht folgt die Lamina densa, die aus Kollagen und Heparansulfat besteht. Die dritte Schicht, die nicht immer vorhanden ist, wird Lamina fibronectina genannt. Diese Schicht bildet eine Verbindung zum subepithelialen Bindegewebe (STORCH und WELSCH, 1994). Dass Mediatoren, die von Keratinozyten freigesetzt werden, die Basalmembran überwinden können, konnte in Versuchen von LUGER et al. (1999) belegt werden. Somit sind Keratinozyten in der Lage durch freigesetzte Mediatoren Effekte auf Endothelzellen ausüben zu können. Keratinozyten setzen als Reaktion auf UV-Bestrahlung alpha-MSH (alpha-melanocyte-stimulating-hormone) frei, das antiinflammatorisch auf Endothelzellen wirkt (LUGER et al., 1999). In eigenen Versuchen induzierten Mediatoren, die von Keratinozyten als Reaktion auf die passive Sensibilisierung freigesetzt wurden, eine Proliferationssteigerung und die vermehrte Ausbildung von VCAM-1 bei

Endothelzellen. Diese Effekte deuten darauf hin, dass Keratinozyten vor allem in der Spätphasenreaktion der Überempfindlichkeit vom Typ I einen Einfluß auf Endothelzellen ausüben. In der Spätphase kommt es vor allem zur Ansammlung von Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile) sowie von T-Helferzellen (QUINLAN et al., 1999). Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität wird als Folge der Einwanderung dieser Zellen eingeleitet (ABBAS et al., 1997).

5.10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit beschränkte sich der Nachweis der Mediatoren, die von Keratinozyten als Reaktion auf die passive Sensibilisierung freigesetzt wurden, auf TNF α , IL-1 β , IL-10 und Stickstoffmonoxid. Durch Einsatz der Microarray-Technik ist es möglich ein breiteres Spektrum von Zytokinen und Rezeptoren zu untersuchen, deren Ausbildung durch die passive Sensibilisierung beeinflusst wird. Diese neue Technik kann weitere Hinweise für die Rolle von Keratinozyten in der immunologischen Abwehrreaktion der Haut hervorbringen.

In eigenen Untersuchungen konnte der Einfluß von Mediatoren, die von Keratinozyten nach passiver Sensibilisierung freigesetzt werden, auf Endothelzellen gezeigt werden. Durch die Übertragung der Zellkulturüberstände von sensibilisierten Keratinozyten auf weitere Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten) kann das Wissen über die Bedeutung von Keratinozyten im Rahmen der immunologisch bedingten Abwehrreaktion der Haut erweitert werden.

Eine weitere Anwendung des Testsystems bietet sich in der Arzneimittelforschung. Durch Vorbehandlung der Keratinozyten mit Testsubstanzen kann die Reaktion der Zellen auf die passive Sensibilisierung beeinflusst werden. Substanzen, die eine reduzierte Freisetzung von z.B. TNF α oder IL-1 β während der passiven Sensibilisierung bewirken, besitzen eventuell eine antiallergische Wirkung. Hier bietet sich die Möglichkeit einer Selektion von wirksamen Stoffen, die dann in *In-vivo*-Modellen getestet werden können. Durch die Vorauswahl wirksamer Testsubstanzen ist eine Reduktion der eingesetzten Versuchstierzahl möglich.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit kann sich in der Allergiediagnostik bieten. Durch die Verwendung des *In-vitro*-Modells der passiven Sensibilisierung bietet sich ein funktionelles Nachweisverfahren für sensibilisiertes Plasma. Durch die Behandlung von Keratinozyten mit Plasma von Allergikern werden die Zellen sensibilisiert. Im nachfolgenden Schritt werden diesen sensibilisierten Zellen unterschiedliche Allergene angeboten. Das spezifische Allergen induziert in den Keratinozyten die Freisetzung von Mediatoren (z.B. TNF α). Die bisherigen *In-vitro*-Allergienachweisverfahren beschränken sich auf den alleinigen Nachweis von allergenspezifischem IgE. Die Resultate aus diesen nichtfunktionellen Nachweismethoden weichen häufig von Ergebnissen aus Intrakutantests, bei denen die Patienten direkten Kontakt mit dem Allergen erhalten, ab. Ein funktioneller Allergietest stellt eventuell eine spezifischere Nachweismethode für Allergien dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Seit 1990 ist bekannt, dass Keratinozyten als Reaktion auf Behandlung mit sensibilisierenden Substanzen eine Vielzahl von Zytokinen freisetzen können. Vor allem Antigene, die über die Haut aufgenommen werden (Kontaktallergene) rufen Reaktionen in Keratinozyten hervor. Dabei treten die epithelialen Keratinozyten als erster Zelltyp mit dem Antigen in Kontakt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von Keratinozyten untersucht werden, die vorher sensibilisiert wurden. Für die passive Sensibilisierung wurden murine Keratinozyten mit Blutplasma behandelt. Dieses Blutplasma wurde von Mäusen gewonnen, die allergisch auf eine topische Applikation von TDI reagierten. In diesem Plasma war ein Gemisch aus verschiedenen Immunglobulinen (IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) vorhanden. Die Grundvoraussetzung dafür, dass Keratinozyten durch die Plasmabehandlung sensibilisiert wurden, war die Existenz von immunglobulinbindenden Rezeptoren. BÈCHEREL et al. (1994) konnten nachweisen, dass Keratinozyten den niedrig-affinen IgE-Rezeptor nach Stimulation mit IL-4 ausbilden konnten. Für IgG konnten von MC KENZIE et al. (1992) sowohl niedrig- als auch hoch-affine Rezeptoren auf der Membran von Keratinozyten nachgewiesen werden. Die Fc-Rezeptornachweise für die verwendeten MSC-P5-Zellen zeigten, dass Fc ϵ RII und Fc γ RI konstitutiv exprimiert wurden, jedoch war ein stimulierender Effekt von IL-4 auf die Rezeptorexpression nicht nachweisbar. Dennoch be-

wirkte eine IL-4-Vorinkubation der Keratinozyten eine verstärkte Freisetzung von NO, TNF α und IL-1 β . Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass IL-4 ohne Wirkung auf die Fc-Rezeptordichte Reaktionen in Keratinozyten induzieren kann. So wird die Reaktion auf eine LPS-Stimulation durch IL-4-Vorinkubation verstärkt. Die Bestimmung von Zytokinen in Überständen passiv sensibilisierter Keratinozyten zeigte, dass eine zusätzliche Inkubation mit den Antigenen zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von TNF α und IL-1 β führt. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde dagegen nicht vermehrt freigesetzt. Dass die Zusammensetzung der Immunglobuline einen starken Einfluß auf die passive Sensibilisierung ausübte, zeigten die Versuche in denen Plasma eingesetzt wurde, welches zu verschiedenen Zeitpunkten nach TDI-Behandlung von den Mäusen gewonnen wurde. Die einzelnen IgG-Subtypen waren in Abhängigkeit der Zeit nach Antigenbehandlung in unterschiedlichen Konzentrationen im Plasma enthalten. Es zeigte sich, dass sich das Plasma, das sieben Tage nach Antigenbehandlung der Mäuse gewonnen wurde, am besten für die passive Sensibilisierung eignete. Hier waren die Unterschiede der TNF α - und IL-1 β -Freisetzung zwischen den TDI-behandelten und den unbehandelten, sensibilisierten Keratinozyten am größten. Da die Überstände der Keratinozyten zur Behandlung von Endothelzellen eingesetzt werden sollten, mußte zunächst der optimale Zeitpunkt der Probenahme bestimmt werden. Es zeigte sich, dass 48 Stunden nach der Zugabe von TDI die größten Konzentrationen von TNF α , IL-1 β und IL-10 gemessen werden konnten. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen wurden die Endothelzellen mit dem Überstand von Keratinozyten behandelt, der 48 Stunden nach Antigengabe gewonnen wurde. Der Überstand von passiv sensibilisierten Keratinozyten, die zusätzlich mit dem Antigen TDI behandelt wurden, führte zu einer signifikanten Proliferationssteigerung von Endothelzellen. Außerdem konnte eine vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, dass Keratinozyten durch Bindung von Immunglobulinen in der Lage sind auf Antigene spezifisch zu reagieren. Durch die Mediatoren, die als Folge der Antigenbindung freigesetzt werden, sind Keratinozyten in der Lage mit Immunzellen zu kommunizieren.

7 SUMMARY

Keratinocytes are major target cells in allergic and irritant contact dermatitis, which can be activated to take part in local reactions by secreting soluble mediators (PALACIO et al., 1997). These mediators are soluble proinflammatory cytokines, chemokines and growth factors, including Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor α (TNF α), IL-3, IL-6, IL-8, transforming growth factor α (TGF α), TGF β and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (WILMER et al., 1994). Cytokines, like IL-1 and TNF α , can bind up receptors on keratinocytes and stimulate the production of additional cytokines, chemokines, and adhesion molecules, modulating the function of other resident cell types in the skin (WILMER et al., 1994). TNF α leads to an early autoinduction of ICAM-1 and later IL-8 (GRIFFITHS et al., 1991). The quality and quantity of cytokines produced by keratinocytes decide whether allergic reactions or tolerance after hapten-painting is initiated (SCHÜLER, 1993). LITTLE et al. (1998) demonstrated, that keratinocytes initiate or amplify the immune events, which occur during the elicitation phase of allergic dermatitis (ACD) and contribute to the pathophysiology of ACD.

Passive sensitization

In the early part of this century, PRAUSNITZ and KÜSTERS (1921) transferred allergen sensitivity from an allergic subject to a naive subject via serum (Prausnitz-Küsters-reaction). Recently it has been shown, that the process of passive sensitization of human leukocytes is possible *in-vitro* (LEVY et al., 1996). In studies on passive sensitization of human bronchus the role of serum IgE was examined (WATSON et al., 1998). Earlier results suggested, that there is a relationship between histamine hypersensitivity and total IgE in serum (WATSON et al., 1997). Now it is discussed whether serum factors, which are associated with high IgE levels, are involved in the process of passive sensitization (WATSON et al., 1998). Compounds, like IL-1 β , TNF α (HAKONARSON et al., 1996) and mast cell tryptase, are potential candidates to be such a factor (RENZETTI et al., 1996). Experiments from RABE et al. (1998) suggested, that specific allergen responsiveness is IgE-dependent. In his experiments human airway smooth muscles were passively sensitized with allergen-specific IgE present in atopic serum. The contractions of these muscles were measured for determining allergic reactions.

In the described *in-vitro*-experiments a passive sensitization of murine keratinocytes was shown. Measuring the release of TNF α , IL-1 β and NO into the supernatants is a tool for investigating the immune reactions. Because immunoglobulin subtypes (IgE and IgG) are involved in allergic reactions, the expression of Fc-receptors on the membrane of keratinocytes is an important requirement for binding immunoglobulins. It was shown by RT-PCR and ELISA that keratinocytes (MSC-P5) express low-affinity IgE-receptors (Fc ϵ R2) as well as low- and high-affinity IgG-receptors. For passive sensitization, keratinocytes were incubated with plasma from BALB/c mice being sensitized for toluene-2,4-diisocyanate (TDI). The time between TDI application in mice and plasma collection had an important effect on passive sensitization of keratinocytes. Best results were achieved with plasma which was collected seven days after TDI application. Binding of TDI (1 μ g/ml) at membrane-bound immunoglobulins induced the release of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) and nitric oxide (NO).

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. und POBER, J.S. (1997):

Cellular and molecular immunology.

W.B. Saunders company, Philadelphia

AIBA, S., NAKAGAWA, S., OZAWA, H., MIYAKE, K., YAGITA und TAGAMI, H. (1993):

Up-regulation of $\alpha 4$ integrin on activated Langerhans cells: analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes.

J. Invest. Dermatol. 100, 143-147

ALBANESI, C., CAVANI, A. und GIROLOMONI, G., (1998):

Interferon- γ -stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules.

J. Invest. Dermatol. 110, 138-142

ALBANESI, C., SCARPONI, C., SEBASTIANI, S., CAVANI, A., FEDERICI, M., DE PITA, O., PUDDU, P. und GIROLOMONI, G. (2000a):

IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines.

J. Immunol. 165, 1395-1402

ALBANESI, C., SCARPONI, C., CAVANI, A., FEDERICI, M., NASORRI, F. und GIROLOMONI G. (2000b):

Interleukin-17 (IL-17) is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- γ and IL-4-induced activation of human keratinocytes.

J. Invest. Dermatol. 165, 1395-1402

ALLPORT, J.R., DING, N.T., AGER, A., STEEBER, D.A., TEDDER, T.F. und LUCINSKAS, F.W. (1997):

L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro.

J. Immunol. 158, 4365-4372

ANTONISSEN, L.A., MITCHELL, R.W., KROEGER, E.A., KEPRON, W., TSE, K.S. und STEPHENS, N.L. (1979):

Mechanical alteration of airway smooth muscle in a canine asthmatic model.

J. Appl. Physiol. 46, 681-687

APEL, M. und BEREK, C. (1990):

Somatic mutations in antibodies expressed by germinal centre B cells early after primary immunization.

Int. Immunol. 2, 813-819

ASHKENAZI, A. und DIXIT, V.M. (1998):

Death receptors: Signalling and modulation.

Science 281, 1305-1308

- AUBOCK, J., ROMANI, N., GRUBAUER, G. und FRITSCH, P. (1986):
HLA-DR expression by keratinocytes is a common feature of diseased skin.
Brit. J. Dermatol. 114, 456-472
- BABBITT, B.P., ALLEN, P.M., MATSUEDA, G., HABER, E. und
UNANUE, E.R. (1985):
Binding of immunogenetic peptides to a Ia histocompatibility molecules.
Nature 317, 359-361
- BAEUERLE, P.A. (1998):
Pro-inflammatory signalling: Last pieces in the NF κ B puzzle?
Curr. Biol. 8, 19-22
- BALDWIN, A.S. (1996):
The NF κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights.
Annu. Rev. Immunol. 14, 649-681
- BARBAUD, A. (2000):
Cutaneous reactions to topical medications.
Rev. Prat. 50, 1324-1328
- BARKER, J.N.W.N., MITRA, R.S., GRIFFITHS, C.E.M., DIXIT, V.M. und
NIKKOLOFF, B.J., (1991):
Keratinocytes as initiators of inflammation.
Lancet 337, 211-214
- BAYON, Y., ALONSO, A. und SANCHES CRESPO, M. (1998):
Immunoglobulin-E/dinitrophenyl complexes induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal
macrophages by a mechanism involving CD23 and NF κ B activation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 570-574
- BEAVIL, A.J., EDMEADES, R.L., GOULD, H.J. und SUTTON, B.J. (1992):
Alpha-helical coiled-coil stalks in the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23)
and related C-type lectins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 753-757
- BÈCHEREL, P.A., MOSSALAYI, M.D., LEGROFF, L., OUAZ, F., DUGAS, B.,
GUILLOSSON, J.J., DEBRE, P. und AROCK, M. (1994):
IgE-dependent activation of Fc epsilon RII/CD23+ normal human keratinocytes: the role
of cAMP and nitric oxide.
Cell. Mol. Biol. 40, 283-290
- BENNER, R. und SAVELKOUL, H.F. (1991):
Regulation of IgE production in mice.
Eur. Respir. J. Suppl. 13, 97-104

- BENVENISTE, E.N., SPARACIO, S.M. und BETHEA, J.R. (1989):
Tumor necrosis factor-alpha enhances interferon-gamma-mediated class II antigen expression on astrocytes.
J. Neuroimmunol. 25, 209-219
- BLAUVELT, A., ASADA, H., KLAUS-KOVTUN, V., A. D., LUCEY, D.R. und I, K.S. (1996):
Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is down regulated by ultraviolet B radiation.
J. Invest. Dermatol. 106, 1047
- BOEHME, M.W., RAETH, U., SCHERBAUM, W.A., GALLIS, P.R. und STREMMEL, W. (2000):
Interaction of endothelial cells and neutrophils in vitro: kinetics of thrombomodulin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): implications for the relevance as serological disease activity markers in vasculitides.
Clin. Exp. Immunol. 119, 250-254
- BOLLAND, S. und RAVETCH, J.V. (1999):
Inhibitory pathways triggered by ITIM- containing receptors.
Adv. Immunol. 72, 149
- BOORSMA, D.M., FLIER, J., SAMPAT, S., OTTEVANGER, C., DE HAAN, P., HOOFT, L., WILLEMZE, R., TENSEN, C.P. und STOOFF, T.J. (1998):
Chemokine IP-10 expression in cultured human keratinocytes.
Arch. Dermatol. Res. 290, 335-341
- BORASCHI, D., BOSSUGRAVE, P., MACCHIA, G., RUGGIERO, P. und TAGLIABUE, A. (1996):
Structure-function relationship in the IL-1 family.
Front. Biosci. 1, 270-308
- BOUR, H., PEYRON, E., GOUCHERAND, M., GARIGUE, J.L., DESVIGNES, C., KAISERLIAN, D., REVILLARD, J.P. und NICOLAS, J.F. (1995):
Major histocompatibility complexes class I-restricted CD8(+) T cells and class II-restricted CD4(+) T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. Eur. J. Immunol. 25, 3006-3010
- BRAUN-FALCO, O., GEILER, G. und JABLONSKA, S. (1991):
Die Haut als Abwehrorgan.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

- BUCKLEY, T.L. und NIJKAMP, F.P. (1994):
Airways hypereactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse: modulation by capsaicin-sensitive nerves.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149, 400-407
- BURROWS, B., MARTINEZ, F.D., HALONEN, M., BARBEE, R.A. und CLINE M.G. (1989):
Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens.
N. Engl. J. Med. 230, 271-277
- CASTELLS-RODELLAS, A., CASTELL, J.V., RAMIREZ-BOSCA, A., NICOLAS, J.F., VALCUENDE-CAVERO, F. und THIVOLET, J. (1992):
Interleukin-6 in normal skin and psoriasis.
Acta. Derm. Venereol. 72, 165-168
- CHAN-YEUNG, M. und MALO, J.L. (1994):
Aeriological agents in occupational asthma.
Eur. Respir. J. 7, 346-371
- CHEN, S.A. (1991):
Mechanisms of IgE homeostasis. Sequestration of IgE by murine type II IgE Fc receptor-bearing B cell hybridomas.
J. Immunol. 147, 1581-1586
- CHI, L., LI, Y., STEHNO-BITTEL, L., GAO, J., MORRISON, D.C., STECHSCHULTE, D.J. und DILEEPAN, K.N. (2001):
Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha.
J. Interferon Cytokine Res. 21, 231-240
- CLYNES, R., MAIZES, J.S., GUINAMARD, R., ONO, M., TAKAI, T. und RAVETCH, J.V. (1999):
Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors.
J. Exp. Med. 198, 179
- CONRAD, D.H. (1990):
The low affinity receptor for IgE.
Ann. Immunol. Rev. 8, 623-645
- CONSTANT, S., PFEIFFER, C., WOODARD, A., PASQUALINI, T. und BOTTOMLY, K. (1995):
Extent of T-cell-receptor-ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T-cells.
J. Exp. Med. 182, 1591-1596

CORRADI, A., FRANZI, A.T. und RUBARTELLI, A. (1995):
Synthesis and secretion of interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes.
Exp. Cell Res. 217, 355-362

CORSINI, E., TERZOLI, A., BRUCCOLERI, A., MARINOVICH, M. und GALLI, C.L. (1997):
Induction of TNF α in vivo by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: Its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs.
J. Invest. Dermatol. 108, 892-896

CROCKET-TORABI (1998):
Selectins and mechanisms of signal transduction.
J. Leukoc. Biol. 63, 1-14

CUMBERBATCH, M., GRIFFITHS, C.E., TUCKER, S.C., DEARMAN, R.J. und KIMBER, I. (1999):
Tumour necrosis factor-alpha induces langerhans cell migration in humans.
Br. J. Dermatol. 141, 192-200

DAERON, M., LATOUR, S., MALBEC, O., ESPINOSA, E., PINA, P., PASMANS, S. und FRIDMAN, W.H. (1995):
The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc γ RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation.
Immunity 3, 635

DAS, K.C., LEWIS-MOLOCK, Y. und WHITE, C.W. (1995):
Thiol modulation of TNF alpha and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B.
Mol. Cell Biochem. 148, 45-57

DAY, M.J. (1996):
Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal langerhans cells and keratinocytes in canine dermatological disease.
J. Comp. Pathol. 115, 317-326

DE ANDRES, B., CARDABA, B., DEL POZO, V., MARTIN-OROZCO, E., GALLARDO, S., TRAMON, P., PALOMINO, P. und LAHOZ, C. (1994):
Modulation of the Fc γ RII und Fc γ RIII induced by GM-CSF, IFN γ and IL-4 on murine eosinophils.
Immunol. 83, 155-160

DE LUCA, L.G., JOHNSON, D.R., WHITLEY, M.Z., COLLINS, T. und POBER, J.S. (1994):
cAMP and tumor necrosis factor competitively regulate transcriptional activation through and nuclear factor binding to the cAMP-responsive element/activating transcription factor element of the endothelial leukocyte adhesion molecule (E-selectin) promoter.
J. Biol. Chem. 269, 19193-19196

DE VRIES, I.J., LANGEVELD-WILDSCHUT, E.G., VAN REIJSEN, F.C., DUBOIS, G.R., VAN DEN HOEK, J.A., BIHARI, I.C., VAN WICHEN, D., DE WEGER, R.A., KNOL, E.F., THEPEN, T. und BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A. (1998):
Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: effects of TNF α and IL-4.

J. Allergy Clin. Immunol. 102, 461-468

DE VRIES, J.E., PUNNONEN, B.G., COCKS, B.G., DE VAAL MALEFYT, R. und AVERSA, G. (1993):

Regulation of the human IgE response by IL-4 and IL-13.

Res. Immunol. 144, 597-601

DEARMAN, R.J. und KIMBER, I. (1991):

Differential stimulation of immune function by respiratory and contact chemical allergens.

Immunol. 72, 563-570

DEARMAN, R.J., BASKETTER, D.A. und KIMBER, I. (1996):

Characterization of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice.

Tox. Appl. Pharm.. 138, 308-316

DELESPESE, G., SARFATI, M. und HOFSTETTER, H. (1988):

Structure, function and clinical relevance of the low affinity receptor for IgE.

Immunol. Invest. 17, 363-387

DELESPESE, G., SUTTER, U., MOSSALAYI, M.D., BETTLER, B., SARFATI, M., HOFSTETTER, H., KILCHERR, E., DEBRE, P. und DALLOUL, H. (1991):

Expression, structure and function of CD23 antigen.

Adv. Immunol. 49, 149-191

DEROCQ, J.M., SEGUI, M., POINOT-CHAZEL, C., MINTY, A., CAPUT, D., FERRARA, P. und CASELLAS, P. (1994):

Interleukin-13 stimulates interleukin-6 production by human keratinocytes.

FEBS Lett. 343, 32-36

DONG, H., ZHU, G., TAMADA, K. und CHEN, L. (1999):

B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion.

Nature med. 5, 1365-1369

DURHAM, S.R. und STEPHEN, J.T. (1998):

Immunologic changes associated with allergen immunotherapy.

J. Allergy Clin. Immunol. 102, 157-164

DURKIN, H.G., AUCI, D.L., CHICE, S.M., SMITH, M.C., MURALI, M.R., BAZIN, H., TARCSAY, L. und DUKOR, P. (1989):

Control of IgE responses.

Clin. Immunol. Immunopathol. 50, 52-72

- ECKERT, R.L. (1992):
The structure and function of the skin.
in: MUKHTAR, H. (Hrsg.): Pharmacology of the skin.
CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 3-12
- ENK, A.H. und KATZ, S.I. (1992):
Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1398-1402
- EVANS, M. und ABDU, N.I. (1994):
Anti-interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in systemic lupus erythematosus.
Lupus 3, 161-166
- FADOK, V.A., SAVILL, J.S., HASLETT, C., BRATTON, D.L., DOHERTY, D.E.,
CAMPBELL, P.A. und HENSON, P.M. (1992):
Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the
phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells.
J. Immunol. 149, 4029-4035
- FARBER, J.M. (1997):
Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.
J. Leukocyte Biol. 61, 246-251
- FORD, M. J. (1983):
Fillagrin.
Int. J. Dermatol. 25, 547
- FRITSCH, P. (1998):
Aufbau und Funktion der Haut.
in: Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas. Springer-Verlag, Berlin, 3-31
- GAD, S.C., DUNN, B.J., DOBBS, D.W., REILLY, C. und WALSH, R.D. (1986):
Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear
swelling test (MEST).
Toxicol. Appl. Pharmacol. 84, 93-114
- GARCIA-BARCINA, M., LUKOMSKA, B., GAWRON, W., WINNOCK, M.,
VIDAL-VANACLOCHA, F., BIOULAC-SAGE, P., BALABAUD, C. und
OLSZEWSKI, W. (1995):
Expression of cell adhesion molecules on liver-associated lymphocytes and their ligands
on sinusoidal lining cells in patients with benign or malignant liver disease.
Am. J. Pathol. 146, 1406-1413
- GASPARI, A.A. und KATZ, S.I. (1988):
Induction and functional characterization of class II MHC (Ia) antigens on murine kerati-
nocytes.
J. Immunol. 140, 2956-2963

- GIRARD, J.P., HAMPAL, A. und BERGER F. (1975):
Antigenic activity, in humans, of purified low molecular weight fractions of timothy pollen. *Dev. Biol. Stand.* 29, 106-12
- GOLDSMITH, L. A. (1983):
Biochemistry and physiology of skin.
Oxford Press, New York
- GRAMAGLIA, I., MAURI, D.N., MINER, K.T., WARE, C.F. und CROFT, M. (1999):
Lymphotoxin is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation.
J. Immunol. 162, 1333-1338
- GRIFFITHS, C.E., BARKER, J.N., KUNKEL, S. und NICKOLOFF, B.J., (1991):
Modulation of leucocyte adhesion molecules, a T-cell chemotaxin (IL-8) and a regulatory cytokine (TNF α) in allergic contact dermatitis (rhus dermatitis).
Br. J. Dermatol. 124, 519-526
- HAKONARSON, H., HERRICK, D.J., GONZALEZ-SERRANO, P. und GRUNDSTEIN, M.M. (1996):
Mechanism of cytokine-induced modulation of β -adrenoceptor responsiveness in airway smooth muscle.
J. Clin. Invest. 97, 2593-2600
- HAMILTON, J.A., MCCARTHY, G. und WHITTY, G. (2001):
Inflammatory microcrystals induce murine macrophage survival and DNA synthesis.
Arthritis. Res. 3, 242-246
- HARRIS, H. und MIYASAKA, M. (1995):
Reversible stimulation of lymphocyte motility by cultured high endothelial cells: mediation by L-selectin.
Immunol. 84, 47-54
- HAWKINS, R.A., RANK, R.G. UND KELLY, K.A. (2000):
Expression of mucosal homing receptor alpha4/beta7 is associated with enhanced migration to the chlamydia-infected murine genital mucosa in vivo.
Infect. Immun. 68, 5587-5594
- HERZ, J.M., THOMSEN, W.J. und YARBROUGH, G.G. (1997):
Molecular approaches to receptors as targets for drug discovery.
J. Recept. Signal Transduct. Res. 17, 671-776
- HEYMANN, E. (1994):
Haut, Haar und Kosmetik - eine chemische Wechselwirkung.
S. Hirzel Verlag Stuttgart

HOLIKOVA, Z., SMETANA, K., BARTUNKOVA, J., DVORANKOVA, B., KALTNER, H. und GABIUS, H.J. (2000):
Human epidermal Langerhans cells are selectively recognized by galectin-3 but not by galectin-1.
Folia Biol. 46, 195-198

HORIO, T., GERSHWIN, M.E. und IKEHARA, S. (2000):
Differentiation from thymic B cell progenitors to mature B cells in vitro.
Immunobiol. 201, 515-526

HORST, E., MEIJER, C.J., RADASZKIEWICZ, T., OSSEKOPPELE, G.J., VAN KRIEKEN, J.H. und PALS, S.T. (1990):
Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression
Cell Immunol. 149, 144-154

HSU, S.M. und HSU, P.L. (1994):
Autocrine and paracrine functions of cytokines in malignant lymphomas.
Biomed. Pharma. 48, 433-444

HULETT, M.D. und HOGARTH, P.M. (1994):
Molecular basis of Fc receptor function.
Adv. Immunol. 57, 1

JACYSYN, J.F., ABRAHAMSOHN I.A. und MACEDO M.S. (2001):
Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen.
Immunology 102, 373-379

JOHNSON, P.R.A., AMMIT, A.J. und CARLIN, S.M. (1997):
Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus.
Eur. Respir. J. 10, 38-43

JUNGHANS, V., JUNG, T. und NEUMANN, C. (1996):
Human keratinocytes constitutively express IL-4 receptor molecules and respond to IL-4 with an increase in B7/BB1 expression.
Exp. Dermatol. 5, 316-324

KARIN, M., LIU, Z.G. und ZANDI, E. (1997):
AP-1 function and regulation.
Curr. Opin. Cell. Biol. 9, 240-246

KAROL, M.H., KRAMARIK, J.A. und FERGUSON, J. (1995):
Methods to assess RAT results in patients exposed to chemical allergens.
Allergy 50, 48-54

KATIRA, A., KNOX, K.A., FINNEY, M., MICHELL, R.H., WAKELAM, M. und GORDON, J. (1993):
Inhibition by glucocorticoid and staurosporine of IL-4-dependent CD23-production in B lymphocytes is reversed on engaging CD40.
Clin. Exp. Immunol. 92, 347-352

KELLER, R. (1987):
Immunologie und Immunopathologie.
Thieme Verlag, Stuttgart

KENNEDY, A.L., STOCK, M.F., ALARIE, Y. und BROWN, W.E. (1989):
Uptake and distribution of ¹⁴C during and following inhalation exposure to radioactive toluene diisocyanate.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 100, 280-292

KITAGAKI, H., FUJISAWA, S., WATANABE, K., HAYAKAWA, K. und SHIOHARA, T. (1995):
Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice.
J. Invest. Dermatol. 105, 749-755

KOBAYASHI, Y., MATSUMOTO, M., KOTANI, M. und MAKINO, T. (1999):
Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in langerhans cell migration and maturation.
J. Immunol. 163, 5989-5993

KRAWIEC, D.R. und GAAFAR, S.M. (1975):
A comparative study of allergic and primary irritant contact dermatitis with dinitrochlorobenzene (DNCB) in dogs.
J. Invest. Dermatol. 65, 248-51

LARCHE, M. und RITTER, M. (1989):
IL-4, oncogenesis and the thymus.
In: KENDALL, M.D. und RITTER, M. (Hrsg.) Thymus update 2. Harwood Academic Publishers, London, 59-72

LE BOUTEILLER, P., DAERON, M., DUC, H.T., RIGHENZI, S. und VOISIN, G.A. (1976):
An ultrastructural study of two different responses of mouse mast cells to transplantation antibodies directed against the same transplantation antigens.
Eur. J. Immunol. 6, 326-32

LEONG, K.H., RAMSHAW, I.A. und RAMSAY, A.J. (1997):
Interleukin-7 enhances cell-mediated immune responses *in vivo* in an interleukin-2-dependent manner.
Viral Immunol. 10, 1-9

- LEVY, D.A. und OSLER, A.G. (1967):
Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. Enhancement of passive sensitization of human leukocytes by heparin.
J. Immunol. 99, 1062-1067
- LITTLE, M.C., METCALFE, R.A., HAYCOCK, J.W., HEALY, J., GAWKRODGER, D.J. und MC NEIL, S. (1998):
The participation of proliferative keratinocytes in the response to sensitizing agents.
Br. J. Dermatol. 138, 45-56
- LUGER, T.A., SCHWARZ, T., KALDEN, H., SCHOLZEN, T., SCHWARZ, A. und BROZKA, T. (1999):
Role of epidermal cell-derived alpha-melanocyte-stimulating-hormone in ultraviolet light mediated local immunosuppression.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 20, 209-216
- MALY, F.E., BOLLHALDER, M. und VONDERSCHMITT, D.J. (1998):
Allergie und Allergene. Von der Molekularbiologie der Allergene.
Allergologie 21, 429-433
- MANETZ, T.S. und MEADE, B.J. (1999):
Development of a flow cytometry assay for the identification and differentiation of chemicals with the potential to elicit irritation, IgE-mediated, or T-cell-mediated hypersensitivity responses.
Toxicol. Sci. 142, 206-217
- MARZIO, R., JIRILLO, E., RANSIJN, A., MAUEL, J. und CORRADIN, S.B. (1997):
Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages.
J. Leukoc. Biol. 62, 349-355
- MATSUSHIMA G.K. und STOHLMAN, S.A. (1991):
Distinct subsets of accessory cells activate Th-1+ triple negative (CD3-, CD4-, CD8-) cells and Th-1 delayed-type hypersensitivity effector T cells.
J. Immunol. 146, 3322-3331.
- MC KENZIE, R.C. und SAUNDER, D.N. (1990):
The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity.
J. Invest. Dermatol. 95, 105-107
- MICHEL, G., NOWOK, K., BEETZ, A., RIED, C., KEMENY, L und RUZICKA, T., (1995):
Novel steroid derivative modulates gene expression of cytokines and growth regulators.
Skin. Pharm. 8, 215-220

MINGARI, M.C., VITALE, C., CAMBIAGGI, A., SCHIAVETTI, F., MELIOLI, G., FERRINI, S. und POGGI A. (1995):
Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production.
Int. Immunol. 7, 697-703

MITCHELL, G.F. (1976):
Studies on immune responses to parasite antigens in mice. Aspects of the T-cell dependence of circulating reagin production to *Ascaris suum* antigens.
Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 52, 79-94

MOORE, K.G. und DANNENBERG, A.M. (1992):
Antigen-specific IgG1-mediated epidermal cell injury: a component of contact hypersensitivity reactions in guinea pigs, measurable *in vitro* in full-thickness skin explants.
J. Invest. Dermatol. 98, 929-935

MOORE, K.W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R. VIEIRA, P. und MOSMANN, T.R. (1993):
Interleukin-10.
Annu. Rev. Immunol. 11, 165

MULLER, G. H., KIRK, R. W. und SCOTT, D. W. (1993):
Kleintierdermatologie.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York

MULLER, G., SALOGA, J., GERMANN, T., BELLINGHAUS, I., MOHAMADZADEH, M., KNOP, J. und ENK, A.H. (1994):
Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12.
J. Clin. Invest. 94, 1799

NABARRA, B. und PAPIERNIK, M. (1988):
Phenotype of thymic stromal cells. An immunoelectron microscopic study with anti-IA, anti-MAC-1, and anti-MAC-2 antibodies.
Lab. Invest. 58, 524-31

NAKAMACHI, K., NAGAI, K., NARIUCHI, H. und KAKIUCHI, T. (1994):
Enhancement of B cell function as antigen-presenting cell during interplay with Th cells.
Immunobiol. 190, 317-332

NICKOLOFF, B.J., BASHAM, T.Y., MERIGAN, T.C., TORSETH, J.W. und MORHENN, V.B. (1986):
Human keratinocyte-lymphocyte reactions *in vitro*.
J. Invest. Dermatol. 87, 11-18

OPPENHEIM, J.J., ZYCCHARIAE, C.O.C., MUKAIDA, N. und MATSUSHIMA, K. (1991):
Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family.
Annu. Rev. Immunol. 9, 617-648

OTTEN, H.G., BOR, B., VERVES, C., VERDONCK, F., DE BOER, M. und DE GAST, G.C. (1996):

Alloantigen-specific T-cell anergy induced by human keratinocytes is abrogated upon loss of cell-cell contact.

Immunol. 88, 214-219

PALACIO, S., SCHMITT, D. und VIAC., J. (1997):

Contact allergenes and sodium lauryl sulfat upregulate vascular endothelial growth factor in normal keratinocytes.

Brit. J. Dermatol. 137, 540-544

PAULI, U., BERTONI, G., DUERR, M. und PETERHANS, E. (1994):

A bioassay for the detection of tumor necrosis factor from eight different species: evaluation of neutralization rates of a monoclonal antibody against human TNF α .

J. Immun. Meth. 171, 263-265

PICKER, L.J., TREER, J.R., FERGUSON-DARNELL, B., COLLINS, P.A.,

BERGSTRESSER, P.R. und TERSTAPPEN, I.W. (1993):

Control of lymphocyte recirculation in man. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells.

J. Immunol. 150, 1122-1136

PIGUET, P.F., GRAU, G.E., HAUSER, C. und VASALLI, P. (1991):

Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions.

J. Exp. Med. 173, 673-679

PRAUSNITZ C. UND KÜSTERS, H. (1921):

Studies in hypersensitivity.

Chem. Abs. 15, 3676

PROUDFOOT, A.E.I. (1998):

The cytokine family. Potential therapeutic targets from allergy to HIV infection.

Eur. J. Dermatol. 8, 147-157

QUENTMEIER, H., KLAUCKE, J., MUHLRADT, P.F. und DREXLER, H.G. (1992):

Role of IL-6, IL-2, and IL-4 in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells.

J. Immunol. 149, 3316-3320

QUINLAN, K.L., SONG, I.S., NAIK, S.M., LETRAN, E.L., OLERUD, J.E., BUNNETT, N.W., ARMSTRONG, C.A., CAUGHMAN, S.W. und ANSET, J.C. (1999):

VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P.

J. Immunol. 162, 1656-1661

RABE, K.F., WATSON, N., DENT, G., MORTON, B.E., WAGNER, K., MAGNUSSEN H. und HEUSSER, C.H. (1998):

Inhibition of human airway sensitization by a novel monoclonal anti-IgE antibody.

Am. J. Respir. Crit. Care. 157, 1429-1435

REIMHOLD, A.M., GRUSBY, M.J., KOSARAS, B., FRIES, J.W.U., MORI, R., MANIWA, S., CLAUSS, I.M., COLLINS, T., SIDMAN, R.L., GLIMCHER, M.J. und GLIMCHER, L.H. (1996):
Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice.
Nature 379, 262-265

RENSING, L. und CORNELIUS, G. (1988):
Grundlagen der Zellbiologie.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

RENZETTI, L.M., PACIOREK, P.M. und TANNU, S.A. (1996):
Pharmacological evidence for tumor necrosis factor as a mediator of allergic inflammation in the airways.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 278, 847-853

RICHARDS, M.L. und KATZ, D.H. (1991):
Biology and chemistry of the low affinity IgE receptor.
Crit. Rev. Immunol. 11, 65-86

ROBERTS, L.K., KRUEGER, G.G und DAYNES, R.A. (1985):
Correlation between the inducible keratinocyte expression of Ia and the movement of Langerhans cells into the epidermis.
J. Immunol. 134, 3781-3784

ROMERO, R., MAYMON, E., PACORA, P., GOMEZ, R., MAZOR, M., YOON, B.H. und BERRY, S.M. (2000):
Further observations on the fetal inflammatory response syndrome: a potential homeostatic role for the soluble receptors of tumor necrosis factor alpha.
Am. J. Obstet. Gynecol. 183, 1070-1077

ROTHLEIN, R. und KIM, Y.B. (1983):
Two distinct mechanisms of cytotoxicity by porcine alveolar macrophages in antibody-dependent and immobilized immune complex-dependent cellular cytotoxicity.
J. Immunol. 131, 1438-1442

ROULSTON, A., REINHARD, C., AMIRI, P. und WILLIAMS, T. (1998):
Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor- α .
J. Biol. Chem. 273, 10232-10239

SALERNO, A., DIELI, F., SIRECI, G., BELLAVIA, A. und ASHERSON, G.L. (1995):
Interleukin-4 is a crucial cytokine in contact sensitivity.
Immunol. 84, 404

SANCHEZ-MADRID, F. und DE LANDAZURI, M.O. (1991):
Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood B lymphocytes. Acquisition of functionally active alpha 4/beta 1-fibronectin receptors upon B cell activation.
Eur. J. Immunol. 21, 2437-2445

SANO, H., HSU, D.K., YU, L., APGAR, J.R., KUWABARA, I., YAMANAKA, T., HIRASHIMA, M. und LIU, F.T. (2000):

Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.

J. Immunol. 165, 2156-2164

SANZ-RODRIGUEZ, F. und TEIXIDO, J. (2001):

Vla-4-dependent myeloma cell adhesion.

Leuk. Lymphoma 41, 239-245

SARFATI, M., BRON, D., LAGNEAUX, L., FONTEYN, C., FROST, H. und DELESPESE, G. (1988):

Elevation of IgE-binding factors in serum of patients with b-CLL derived chronic lymphocyte leukemia.

Blood 71, 94-98

SATO, M., SAWAMURA, D., INA, S., YAGUCHI, T., HANADA, K. und HASHIMOTO, I. (1999):

In vivo introduction of the interleukin-6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin-6, but not by the alternatively spliced form.

Arch. Dermatol. Res. 291, 400-404

SAUDER, D.N. (1991):

The skin as an immunologic organ.

In: SOTER, N.A. und BADEN, H.P (Hrsg.): Pathophysiology of dermatology diseases.

McGraw-Hill, New York, 101-110

SAWAMURA, D., MENG, X., INA, S., SATO, M., TAMAI, K., HANADA, K. und HASHIMOTO, I. (1998):

Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by *in vivo* introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes.

J. Immunol. 161, 5633-5639

SCHEERENS, H., BUCKLEY, T.L., DAVIDSE, E.M., GARSSEN, J., NIJKAMP, F.P. und VAN LOVEREN, H. (1996):

Toluene diisocyanate-induced *in vitro* tracheal hyperreactivity in the mouse airways.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149, 858-865

SCHEERENS, H., BUCKLEY, T.L., MUIS, T.L., GRSSSEN, J., DORMANS, J., NIJKAMP, F.P. und VAN LOVEREN, H. (1999):

Long-term topical exposure to toluene diisocyanate in mice leads to antibody production and *in vivo* airway hyperresponsiveness three hours after intranasal challenge.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159, 1074-1080

SCHNYDER, U.W. (1960):

Neurodermitis - Asthma - Rhinitis. Eine genetisch-allergologische Studie.

Arch. Allergy Appl. Immunol 17, Karger Basel

- SCHÜLER, G. (1993):
Kontaktallergie.
Wien Klin. Wochenschr. 105, 641-647
- SCHWARZ, R. (1979):
Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog.
J. Vet. Res. 46, 105
- SCHWARZENBERGER, K. und UDEY, M.C. (1996):
Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression *in situ*.
J. Invest. Dermatol 106, 553-558
- SEBZDA, E., MARIATHAS, S., OHTEKI, T., JONES, R., BACHMANN, M.F. und OHASHI, P.S. (1999):
Selection of the T cell repertoire.
Annu. Rev. Immunol. 17, 829-874.
- SEMAN, M., REGNIER, D., HERMIER, B. und DUBERT, J.M. (1982):
Immune response to the p-azobenzene arsonate (ABA)-GAT conjugate: role of I region genes in the selective activation of ABA-specific or GAT-specific T helper cells.
J. Immunol. 129, 2082-2088
- SHORTMAN, K. und WU, L. (1996):
Early T lymphocyte progenitors.
Annu. Rev. Immunol. 14, 29-47
- SIBERBERG-SINAKIN, I., THORBECKE, G.J., BAER, R.I., ROSENTHAL, S.A. und BEREZOWSKY, V. (1976):
Antigen-bearing langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes.
Cell. Immunol. 25, 137-151
- STANWORTH, D.R., HUMPHREY, J.H., BENNICH, H. und JOHANNSON, S.G.O. (1967):
Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. Lancet 11, 330-332
- STEIGLEITER, G. K. (1991):
Struktur von Epidermis und Dermis - eine Einführung
in: BRAUN-FALCO, O., GEILER, G. und JABLONSKA, S. (Hrsg.). Die Haut als Abwehrorgan. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- STEINMANN, R., HOFFMANN, L. UND POPE, M. (1995):
Maturation and migration of cutaneous dendritic cells.
J. Invest. Dermatol. 105, 2-7
- STRIETER, R. M., LUKACS, N. W., STANDIFORD, T. J. und KUNKEL, S. L. (1993):
Cytokines and lung inflammation: Mechanisms of neutrophil recruitment to the lung.
Thorax 48, 765-769

- STRYER, L. (1985):
Biochemie.
Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig/Wiesbaden
- SUANKRATAY, C., ZHANG, Y., JONES, D., LINT, T.F. und GEWURZ, H. (1999):
Enhancement of lectin pathway haemolysis by immunoglobulins.
Clin. Exp. Immunol. 117, 435-41
- SUGIHARA, A., INABA, M., MORI, S.I., TAKETANI, S., ADACHI, Y., HISHA, H.,
INABA, K., TOKI, J., HORIO, T., GERSHWIN, M.E. und IKEHARA, S. (2000):
Differentiation from thymic B cell progenitors to mature B cells *in vitro*.
Immunobiol. 201, 515-526
- SYMINGTON, F.W. und SANTOS, E.B. (1991):
Lysis of human keratinocytes by allogenic HLA class I-specific cytotoxic T cells. Kerati-
nocyte ICAM-1 (CD54) and T cell LFA-1 (CD11a/CD18) mediate enhanced lysis of INF γ
treated keratinocytes.
J. Immunol 146, 2169-2175
- TARTAGLIA, L.A., PENNICA, D. und GOEDDEL, D.V. (1993):
Ligand passing: the 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signal-
ling by the 55 kDa TNF receptor.
J. Biol. Chem. 268, 18542-18548
- TIGALONOWA, M., BJERKE, J.R. und MATRE, R. (1991):
Fc γ -receptors on langerhans cells and keratinocytes in suspension from normal skin cha-
racterized using soluble immune complexes and monoclonal antibodies.
Acta. Derm. Venerol. 71, 99-103
- VAINER, B., NIELSEN, O.H. und HORN, T. (2000):
Comparative studies of the colonic *in situ* expression of intercellular adhesion molecules
(ICAM-1, -2, and -3), beta2 integrins (LFA-1, Mac-1, and p150,95), and PECAM-1 in ul-
cerative colitis and Crohn's disease.
Am. J. Surg. Pathol. 24, 1115-1124
- VAN PELT, L.J., DE CRAEN, A.J., LANGVELD, N.E. und WEENING, R.S. (1997):
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ameliorates chemotherapy-
induced neutropenia in children with solid tumor.
Pediatr. Hematol. Oncol. 14, 539-545
- VAN WAUWE, J., AERTS, F., VAN GENECHTEN, H., BLOCKX, H.,
DELEERSNIJDER, W. und WALTER, H. (1996):
The inhibitory effect of pentamidine on the production of chemotactic cytokines by *in vitro*
stimulated human blood cells.
Inflamm. Res. 45, 357-363
- VASSALLI, P. (1992):
The pathophysiology of tumor necrosis factors.
Annu. Rev. Immunol. 10, 411-452

VERCELLI, D. (1993):
Regulation of IgE synthesis.
Allergy Proc. 14, 413-416

VERDEGAAL, M.E., ZEGVELD, S.T. und VAN FURTH, R. (1996):
Heat shock protein 65 induces CD62e, CD106, and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes.
J. Immunol. 157, 369-376

VON SCHWEDLER, U., JÄCK, H.M. und WAHL, M. (1990):
Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement.
Nature 345, 452-456

WALDMANN, T.A., IIO, A., OGAWA, M., MC INTYRE, O.R. und STROBER, W. (1976):
The metabolism of IgE. Studies in normal individuals and in a patient with IgE myeloma.
J. Immunol. 117, 1139-1144

WALDORF, H.A., WALSH, L.J., SCHENTER, N.M. und MORPHY, G.F. (1991):
Early cellular events in evolving cutaneous delayed hypersensitivity in humans.
Am. J. Pathol. 138, 477-486

WALKER, C., BODE, E., BOER, L., HANSEI, T.T., BLASER, K. und VIRCHOW, J.C. (1992):
Allergic and non allergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage.
Am. Rev. Respir. Dis. 146, 109-115

WANG, B., ZHUANG, L., FUJISAWA, H., SHINDER, G.A., FELICIANI, C., SHIVJI, G.M., SUZUKI, H., AMERIO, P., TOTO, P. und SAUDER, D.N. (1999):
Enhanced epidermal langerhans cell migration in IL-10 knockout mice.
J. Immunol. 162, 277-283

WATSON, N., BODTKE, K. und COLEMAN, R.A. (1997):
Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways.
Am. J. Respir. Crit. Care. 155, 839-844

WATSON, N., RÜHLMANN, E., MAGNUSSEN, H. und RABE, K.F. (1998):
Histamine hypersensitivity induced by passive sensitization of human bronchus: effect of serum IgE depletion.
Cl. Exp. Allergy 28, 679-685

WEHNER, R. und GEHRING, W. (1990):
Zoologie.
Thieme Verlag, Stuttgart

WEISS, J.M., SLEEMAN, J., RENKL, A.C., DITTMAR, H., TERMEER, C.C, TAXIS, S., HOWELLS, N., HOFMANN, M., KOHLER, G., SCHOPF, E., PONTA, H., HERRLICH, P. und SIMON, J.C. (1997):

An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function.

J.Cell. Biol. 137, 1137-1147

WELTZIEN, H.U., MOULON, C., MARTIN, S., PADOVAN, E., HARTMANN, U. und KOHLER, J. (1996):

T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. Toxicol. 107, 141-151

WILLIAMS, I.R., ORT, R.J. und KUPPER, T.S. (1994):

Keratinocyte expression of B7-1 in transgenic mice amplifies the primary immune response to cutaneous antigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12780-12784

WILLIAMSON, A.R., ZITRON, I.M. und MC MICHAEL, A.J. (1976):

Clones of B lymphocytes: their natural selection and expansion.

Fed. Proc. 35, 2195-2201

WILMER, J.L., BURLESON, F.G., KAYAMA, F., KANNO, J. und

LUSTER, M.J. (1994): Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin.

J. Invest. Dermatol. 102, 915-922

WOLFF, K. und STINGL, G. (1983):

The langerhans cell.

J. Invest. Dermatol. 80, 175-215

WOLLENBERG; A., DE LA SALLE, H., HANAU, D. LIU, F.T. und BIEBER, T. (1993):

Human keratinocytes release the endogenous beta-galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms.

J. Exp. Med. 178, 777-785

YAMAGUCHI, T., KOHROGI, H., HONDA, I., KAWANO, O., SUGIMOTO, M.,

ARAKI, S. und ANDO, M. (1992):

A novel leukotriene antagonist, ONO-1079, inhibits and reverses human bronchial contraction induced by leukotrienes C4 and D4 and antigen *in vitro*.

Am. Rev. Respir. Dis. 146, 923-929

YANG, C.M., LUO, S.F., WANG, C.C., CHIU, C.T., CHIEN, C.S., LIN, C.C. und

HSIAO, L.D. (2000):

TNF α and IL-1 β stimulated cell proliferation through activation of mitogen-activated protein kinase in canine tracheal smooth muscle cells.

Br. J. Pharmacol. 130, 891-899

YANG-YEN, H.F. (1990):

Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction.

Cell 62, 1205-1215

YONG, K. und KHWAJA, A. (1990):

Leukocyte cellular adhesion molecules.

Blood Rev. 4, 211-225

ZELLER, J.M. und SULLIVAN, B.L. (1993):

Monoclonal antibody to the type II Fc receptor for human IgG blocks potentiation of monocyte and neutrophil IgG-induced respiratory burst activation by aggregated c-reactive protein.

Cell Immunol. 149, 144-154

ZEPTER, K., HAFFNER, A., SOOHOO, L.F., DE LUCA, D., TANG, H.P., FISHER, P., CHAVINSON, J. und ELMETS, C.A. (1997):

Induction of biologically active IL-1 β converting enzyme and mature IL-1 β in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli.

J. Immunol. 159, 6203-6208

ZHANG, K., MILLS, F.C. und SAXON, A. (1994):

Switch circles from IL-4-directed ϵ class switch from human B lymphocytes. Evidence for direct, sequential, and multiple step sequential switch from μ to ϵ heavy chain gene.

Immunol. 152, 3427-3435

9 ANHANG

MW=Mittelwert, STD=Standardabweichung

Tabelle 3 : Nachweis von CD23 auf Keratinozyten mit Fluoroskan II, n=6

Fluoreszenzintensität								
IL-4 [ng/ml]	0	15,625	31,25	62,5	125	250	500	750
FcεRII								
MW	1641,50	1746,00	1830,00	1661,67	1687,33	1797,33	1691,00	1685,50
STD	70,00	47,95	193,20	31,75	56,45	77,26	33,00	23,33
Isotypk.								
MW	1540,67	1592,00	1742,00	1639,67	1760,33	1793,00	1654,33	1727,67
STD	66,30	39,66	240,76	22,90	234,66	101,39	83,29	168,39

Tabelle 4: Vitalität von Keratinozyten nach Behandlung mit TDI über 48 Stunden, n = 6

Cell Titer® [%, unbehandelte Kontrolle = 100%]							
TDI [µg/ml]	0	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10
MW	100.00	93.51	90.96	92.50	93.55	96.75	92.50
STD	6.66	4.21	7.33	4.32	4.51	5.31	5.76

Tabell 5: Freigesetzte TNFα-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung ohne Vorinkubation mit IL-4, n=6

TNFα [pg/ml]	ns	ns+	Sen	sen+
MW	17,96	12,77	14,58	19,76
STD	8,71	9,23	9,47	8,27

Tabelle 6: Freigesetzte TNFα-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorinkubation mit IL-4, n=6, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) Vergleich zu ns

TNFα [pg/ml]	Ns	ns+	sen	sen+
MW	17,96	16,11	11,63	40,36
STD	8,71	12,38	10,88	5,99 (*)

Tabelle 7: Freigesetzte NO-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung ohne Vorbehandlung mit IL-4, n=5

NO ₂ [nmol/l]	Ns	ns+	sen	sen+
MW	4,39	3,79	4,20	4,29
STD	0,57	0,42	0,25	0,48

Tabelle 8: Freigesetzte NO-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4, n=5, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) Vergleich zu ns

NO ₂ [nmol/l]	ns	ns+	sen	Sen+
MW	3,74	3,92	4,62	5,72
STD	0,23	0,35	0,42	0,74 (*)

Tabelle 9: Freigesetzte IL-1 β -Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4, n=5, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) Vergleich zu ns

IL-1 β [pg/ml]	ns	ns+	sen	sen+
MW	4,93	5,15	4,54	7,37
STD	0,96	0,26	0,89	1,27 (*)

Tabelle 10: Freigesetzte IL-10-Menge von Keratinozyten 48 Stunden nach TDI-Behandlung nach Vorbehandlung mit IL-4, n=5

IL-10 [pg/ml]	ns	ns+	sen	sen+
MW	2,87	3,12	2,91	4,78
STD	0,16	0,12	0,46	1,93

Tabelle 11: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die Vitalität von Keratinozyten während der passiven Sensibilisierung, n=6

Zeit [d]	0	0,3	2	7	14	21
ohne TDI						
MW	100,09	119,21	119,10	114,15	92,19	106,42
STD	9,71	13,33	6,78	11,95	2,71	7,00
mit TDI						
MW	101,59	126,91	115,16	111,14	93,78	104,66
STD	5,37	18,04	4,26	11,89	3,59	9,59

Tabelle 12: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die TNF α -Freisetzung (pg/ml) von Keratinozyten während der passiven Sensibilisierung, n=6, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) Vergleich zur nicht mit TDI behandelten Kontrolle

Zeit [d]	ns	0,3	2	7	14	21
ohne TDI						
MW	2,55	2,72	2,47	2,56	4,04	4,95
STD	0,20	0,50	0,16	0,29	0,48	0,69
mit TDI						
MW	2,42	2,57	3,00	3,63 (*)	4,73 (*)	4,34
STD	0,08	0,23	1,29	1,06	0,27	0,53

Tabelle 13: Einfluß der Zeitspanne zwischen TDI-Behandlung und Plasmaentnahme auf die IL-1 β -Freisetzung (pg/ml) von Keratinozyten während der passiven Sensibilisierung, n=6,

Zeit [d]	ns	2	7	21
ohne TDI				
MW	4,04	2,90	1,88	5,95
STD	1,47	1,31	1,99	2,92
mit TDI				
MW	1,06	4,93	5,25	7,60
STD	1,18	3,00	3,84	2,47

Tabelle 14: Zeitkurve der TNF α -Freisetzung (pg/ml) von Keratinozyten nach TDI-Behandlung, n=4

Zeit [h]	2	4	8	24	48
ns+					
MW	<3,00	<3,00	<3,00	<3,00	
STD	-	-	-	-	
sen					
MW	<3,00	<3,00	4,54	<3,00	<3,00
STD	-	-	1,81	-	-
sen+					
MW	<3,00	3,45	3,33	5,20	4,40
STD	-	0,91	0,56	1,67	0,48

Tabelle 15: Zeitkurve der IL-1 β -Freisetzung (pg/ml) von Keratinozyten nach TDI-Behandlung, n=4

Zeit [h]	4	8	24	48
ns+				
MW	4,16	4,00	3,66	3,97
STD	1,69	1,55	1,32	1,94
sen				
MW	4,38	3,61	3,38	4,20
STD	1,33	0,72	0,51	0,51
sen+				
MW	3,82	<3,00	<3,00	6,89
STD	1,63	-	-	0,44

Tabelle 16: Zeitkurve der IL-10-Freisetzung (pg/ml) von Keratinozyten nach TDI-Behandlung, n=4

Zeit [h]	1	2	4	8	24	48
ns+						
MW	3,18	<3,00	<3,00	<3,00	<3,00	3,13
STD	0,36	-	-	-	-	0,11
sen						
MW	3,37	<3,00	3,12	<3,00	<3,00	3,15
STD	0,74	-	0,23	-	-	0,30
sen+						
MW	<3,00	3,31	<3,00	3,21	3,24	4,95
STD	-	0,61	-	0,42	0,48	1,66

Tabelle 17: Proliferation von bend.3-Zellen nach der Behandlung mit Zellkulturüberstand von sensibilisierten Keratinozyten, n=6, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns

BrdU-Einbau	Ns	ns+	sen	sen+
MW	100,00	112,35	150,23 (*)	178,88 (*)
STD	20,32	14,12	21,88	7,89

Tabelle 18: Expression von VCAM-1 (Fluoreszenzintensität) auf Endothelzellen nach der Behandlung mit Zellkulturüberstand von sensibilisierten Keratinozyten, n=6

VCAM-1	Ns	ns+	sen	sen+
MW	100.00	432.58	370.79	1025.84
STD	182.28	607.07	344.08	840.09

Tabelle 19: Einfluß unterschiedlicher IgE-Verdünnungen auf die Freisetzung von TNF α (pg/ml) aus Keratinozyten 48 Stunden nach DNP-BSA Inkubation, n=6

IgE-Verdünnung [µl IgE/10 ml Medium]	20	30	50	100
ohne DNP				
MW	30,89	28,74	27,97	30,28
STD	2,77	2,79	1,88	3,58
mit DNP				
MW	29,20	29,35	29,20	39,49
STD	3,01	5,67	1,72	14,32

Tabelle 20: Freisetzung von TNF α (pg/ml) aus Keratinozyten 48 Stunden nach DNP-BSA Inkubation, n=6, p<0,05 (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zu ns 1000 μ g/ml DNP-BSA

DNP-BSA [μ g/ml]	0	10	30	100	300	1000
TNF α [pg/ml]						
ns						
MW	12,44	12,39	10,31	9,04	6,71	4,71
STD	0,51	3,38	3,33	4,36	3,54	1,63
sen						
MW	9,90	9,16	6,35	7,23	6,83	10,57 (*)
STD	2,81	2,83	2,64	3,52	3,23	3,59

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Radebeul, den 26.02. 2002