

**Charakterisierung von Monozyten,
inflammatorischen dendritischen epidermalen
Zellen und Langerhans Zellen bei Patienten
mit atopischem Ekzem, Psoriasis vulgaris und
gesunden Spendern**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Julia Jessica Jockers

aus

Berlin

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: PD Dr. med. N. Novak
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus

Tag der Promotionsprüfung: 28.3.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert worden.

Erscheinungsjahr 2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum Mai 2003 bis Mai 2005 von Frau PD Dr. med. N. Novak und Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht (gemäß §6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004).

Bonn, den 1.12.2005

Julia Jessica Jockers

*„Um Gottes Gedanken zu verstehen,
müssen wir Statistiken studieren
denn diese sind das Maß seiner Absichten.“*

F. Nightingale

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Grundlagen | 3 |
| 2.1 | Aspekte der adaptiven Immunantwort | 3 |
| 2.1.1 | Monozyten | 3 |
| 2.1.2 | Dendritische Zellen | 5 |
| 2.2 | Atopisches Ekzem und Psoriasis vulgaris | 9 |
| 2.2.1 | Atopisches Ekzem | 9 |
| 2.2.2 | Psoriasis vulgaris | 13 |
| 2.3 | Wahl des Zellsystems | 15 |
| 2.4 | Oberflächenrezeptoren | 16 |
| 2.4.1 | Selektine | 17 |
| 2.4.2 | Integrine | 18 |
| 2.4.3 | Tetraspanine | 21 |
| 2.5 | Cytohesin-1 | 22 |
| 3 | Zielsetzung | 27 |
| 4 | Materialien und Methoden | 29 |
| 4.1 | Materialien | 29 |
| 4.1.1 | Geräte | 29 |
| 4.1.2 | Chemikalien | 30 |
| 4.1.3 | Zelllinie, Zellkultur-Medien und Seren | 32 |
| 4.1.4 | Enzyme und Cytokine | 32 |
| 4.1.5 | Antikörper | 33 |
| 4.1.6 | IgE und FITC-gekoppeltes <i>Bet v 1</i> -Allergen | 36 |
| 4.1.7 | Proteinbiochemische Hilfsmittel | 37 |
| 4.1.8 | Wässrige Lösungen | 37 |
| 4.2 | Methoden | 38 |
| 4.2.1 | Einbezogene Personengruppen | 38 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2.2 | Bestimmung des IgE im Serum | 39 |
| 4.2.3 | Anreicherung und Kultivierung von primären Zellen aus dem peripheren Blut | 41 |
| 4.2.4 | Stimulation von Zellen | 43 |
| 4.2.5 | Funktionsanalysen | 44 |
| 4.2.6 | Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 4.2.7 | Statistik | 55 |
| 5 | Ergebnisse | 57 |
| 5.1 | Phänotypisierung der Monozyten, LC und IDEC | 57 |
| 5.1.1 | Expression der Selektine | 59 |
| 5.1.2 | Expression der Integrine | 63 |
| 5.1.3 | Expression der Tetraspanine | 80 |
| 5.1.4 | Expression der Fc-Rezeptoren für IgE und IgG auf Monozyten | 93 |
| 5.1.5 | Expression von MHC-Molekülen auf Monozyten | 94 |
| 5.1.6 | Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf Monozyten | 96 |
| 5.2 | Adhäsionsversuche mit DC | 97 |
| 5.3 | Expression von Cytohesin-1 | 99 |
| 5.4 | Aufnahme des <i>Bet v 1</i> -Allergens | 102 |
| 6 | Diskussion | 107 |
| 6.1 | Vor- und Nachteile des Zellsystems | 107 |
| 6.2 | Phänotypen beim AE und bei der Pso | 107 |
| 6.2.1 | Die Selektine | 109 |
| 6.2.2 | Die Integrine | 112 |
| 6.2.3 | Die Tetraspanine | 121 |
| 6.2.4 | Expression der Fc-Rezeptoren für IgE und IgG auf Monozyten | 128 |
| 6.2.5 | Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Rezeptoren auf Monozyten | 129 |
| 6.3 | Ausblick | 130 |

| | |
|--|---------------|
| <i>INHALTSVERZEICHNIS</i> | iii |
| 7 Zusammenfassung | 137 |
| A Anhang | I |
| A.1 Phänotypisierungsdaten der Oberflächenmarker | I |
| A.2 Migrationsversuche | XIII |
| A.3 Heterodimere der untersuchten Integrinketten | XIV |
| A.4 Signifikante Unterschiede der Phänotypen | XV |
| Abbildungverzeichnis | XXI |
| Abkürzungsverzeichnis | XXV |
| Literaturverzeichnis | XXVIII |
| Lebenslauf | LI |
| Danksagung | LIII |

1 Einleitung

Seit einigen Jahrzehnten wird eine ständig zunehmende Zahl der Patienten mit Allergien beobachtet. Vor allem in den westlichen Industrienationen zeigen annähernd 20% - 30% der Bevölkerung allergische Reaktionen auf eigentlich harmlose Substanzen wie Pollen, Tierhaare oder Lebensmittel [Janeway et al., 2002]. Diese Reaktion des Immunsystems äußert sich in Form von allergischer Rhinitis, Asthma und / oder atopischem Ekzem.

Von Atopie wird gesprochen, wenn der Patient eine genetische, familiäre Veranlagung besitzt, auf deren Basis sich im Laufe des Lebens eine atopische Erkrankung manifestieren kann. Die Ursache des atopischen Ekzems liegt in einer Überreaktion des Immunsystems begründet, jedoch sind die Faktoren, die zu der Erkrankung beitragen komplex. Eine Schlüsselrolle spielen dabei dendritische Zellen und ihre Vorläuferzellen die Monozyten. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit sich das Wanderungsverhalten dieser Zellen beim atopischen Ekzem vom gesunden Zustand unterscheidet.

Als Referenzerkrankung der Haut wurde die Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) gewählt. Sie ist ebenfalls eine häufig auftretende, chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut. Etwa 2% der Bevölkerung der westlichen Industrienationen sind davon betroffen [Prinz, 2003]. Beide Erkrankungen werden von speziellen Zellen des Immunsystems, den T-Lymphozyten, vermittelt. Eine Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt durch die Präsentation eines Antigens, sowie der Stimulation der T-Lymphozyten durch dendritische Zellen.

Sowohl die Migrationsfähigkeit als auch die Signalübertragung der Monozyten und dendritischen Zellen spielen bei beiden Erkrankungen eine wichtige Rolle beim Pathomechanismus. Mit der vorliegenden Arbeit werden neue Erkenntnisse zur Adhäsionsfähigkeit, Migrationsfähigkeit und Signalübertragung für Monozyten und zwei DC-Subtypen der dendritischen Zellen aus der Haut vorgestellt.

2 Grundlagen

2.1 Aspekte der adaptiven Immunantwort

Da es in dieser Arbeit hauptsächlich um Zellen der adaptiven Immunantwort geht, sollen hier einige Aspekte näher behandelt werden. Im Gegensatz zur innaten Immunantwort entwickelt sich die adaptive Immunantwort nach der Geburt. Hierbei werden spezifische Antigene erkannt und nicht wie bei der innaten Immunantwort einige in der Natur häufig vorkommende Moleküle, die die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ definieren. Lipopolysaccharid ist z. B. nur auf den Oberflächen einiger Bakterien vorhanden, nicht aber im Menschen und wird daher bei der innaten Immunantwort als fremd erkannt. Dendritische Zellen und T-Zellen gehören zur adaptiven Immunantwort. B-Zellen und Monozyten können fremde Moleküle direkt erkennen und im Fall von Monozyten phagozytieren. Anschließend reifen Monozyten und B-Zellen aus. Monozyten können das Antigen präsentieren während B-Zellen Antikörper sezernieren. Die Antikörper können an das Pathogen binden und z. B. Makrophagen aktivieren. B-Zellen und Monozyten können daher als Teil der innaten Immunantwort betrachtet werden. Durch die Antigenpräsentation und Antikörpersezernierung wird zudem die adaptive Immunantwort gefördert.

2.1.1 Monozyten

Monozyten stellen, wie eben schon beschrieben, ein Bindeglied zwischen inna-ter und adaptiver Immunantwort dar. Sie stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Im Knochenmark können diese Stammzellen u. a. zu myeloiden Vorläuferzellen differenzieren. Aus diesen myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich alle Zellen des Blutes mit Ausnahme der B- und T-Zellen. Monozyten sind mit einem Durchmesser von 12-25 μm die größten Zellen im Blut. Sie besitzen ein klares Zytoplasma und einen bohnenförmigen Kern. Monozyten gelangen mit dem Blut in alle Gewebe des Körpers und können dort zu Mastzellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen (DC) ausdifferenzieren.

Auf der Oberfläche der Monozyten wird der Rezeptor CD14 exprimiert, mit dem Lipopolysaccharid erkannt werden kann. Dadurch besitzen Monozyten die Fähigkeit, Fremdstoffe zu phagozytieren und prozessieren. Anschließend können Monozyten die Fragmente der prozessierten Fremdstoffe in den Rezeptoren des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (major histocompatibility complex, MHC) der Klasse I und der Klasse II präsentieren. Monozyten, Makrophagen und DC sind so genannte antigenpräsentierende Zellen (APC), welche T-Zellen aktivieren können.

Monozyten wandern nicht zufällig aus dem Blutstrom in ein Gewebe ein. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Chemokinrezeptoren, die ihnen erlauben, entlang eines Chemokingradienten in ein Gewebe einzuwandern. Sie exprimieren die Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 und CXCR4 [Kim, 2004].

Die in der Haut vorhandenen Langerhans Zellen (LC) können ein Antigen aufnehmen und produzieren durch diese Aktivierung u. a. CCL2/ MCP-1 (monocyte/macrophage chemoattractant protein 1), CCL3/MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES (regulated on activation normal T cells expressed and secreted) und CCL17/TARC (Thymus und Aktivierung-regulierendes Chemokin). Auch die Keratinozyten geben nach einer Aktivierung verschiedene Chemokine ab, wie z. B. CCL17/TARC, CCL5/RANTES und CCL22/MDC [Novak et al., 2003a, Kim, 2004, Novak et al., 2005]. All diese Chemokine bilden durch Diffusion einen Gradienten. Dieser Gradient leitet die Monozyten zum entzündeten Gewebe.

Die meisten Chemokinrezeptoren werden nach einer etwa 30s dauernden Interaktion mit ihrem Liganden inaktiviert. Dies erfolgt durch Phosphorylierung ihrer zytoplasmatischen Domäne [Kim, 2004]. Dennoch reicht diese kurze Interaktionszeit aus, um ein Signal von außen in die Zelle zu leiten („outside-in signaling“). Dadurch werden weitere Oberflächenrezeptoren der Monozyten aktiviert, wie z. B. die Integrine. Durch diese Aktivierung ist es den Monozyten möglich, mit Rezeptoren, die an der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert werden, zu interagieren. Schließlich werden die Monozyten relativ zum Blutstrom langsamer und adhären an den Endothelzellen. Dann können die

Monozyten in das umgebende Gewebe einwandern.

2.1.2 Dendritische Zellen

Der Name „dendritische Zelle“ (DC) stammt von ihrer Form ab. Sie besitzen viele Ausläufer (Dendriten), um eine möglichst große Oberfläche zur Interaktion mit den T-Zellen zu bilden. Das erste Mal wurden sie in der Mitte der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts von R. Steinmann beschrieben [Steinman and Cohn, 1973, Steinman and Cohn, 1974, Steinman et al., 1975]. DC exprimieren sowohl Rezeptoren der MHC-Klasse I als auch Rezeptoren der MHC-Klasse II an ihrer Oberfläche. In diesen Rezeptoren werden Antigene den T-Zellen präsentiert.

Die DC des Menschen werden in drei Gruppen eingeteilt: dermale DC, interstitielle DC und plasmazytoide DC [Lipscomb and Masten, 2002]. Langerhans Zellen (LC) gehören zu den dermalen DC, werden jedoch häufig als eine separate Gruppe der DC behandelt. Alle Gruppen stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab. Interstitielle DC und dermale DC sind myeloider Herkunft, während plasmazytoide DC plasmazytoider Herkunft sind. Auf die Gruppe der plasmazytoiden DC soll hier nicht näher eingegangen werden. Die myeloiden Vorläuferzellen können zu Granulozyten oder zu Monozyten und Vorläuferzellen der LC ausreifen, die mit dem Blut in die verschiedenen peripheren Gewebe transportiert werden. Diese Vorläuferzellen reifen in der Haut zu dermalen DC. Dies benötigt die Gegenwart von GM-CSF und IL-4 oder TNF- α . Bei zusätzlicher Gegenwart von TGF- β reifen aus den Vorläuferzellen LC heran. Das kann auch *in vitro* erreicht werden [Sallusto and Lanzavecchia, 1994].

Sowohl LC als auch dermale DC haben eine „Wächterfunktion“. Als unreife DC haben sie eine hohe Kapazität zur Antigenaufnahme und -prozessierung und weisen eine starke Expression von Fc-Rezeptoren auf. In diesem Stadium exprimieren sie nur wenige Rezeptoren der MHC-Klasse II sowie kostimulatorische Rezeptoren. Sie haben daher nur eine schwache Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren.

DC wandern wie Monozyten anhand von Chemokingradienten zu Entzündungsherden. Dort nehmen sie durch Phagozytose, Pinozytose oder Endozytose

Antigene auf. Antigene, die durch Pinzytose oder Endozytose aufgenommen wurden, werden in frühen und späten Endosomen in kleine Peptide zersetzt. Die späten Endosome vereinigen sich mit Vesikeln (MIIC), die viele Rezeptoren der MHC-Klasse II mit den daran gebundenen invarianten Ketten enthalten. Die invarianten Ketten werden durch verschiedene Proteine von den Rezeptoren der MHC-Klasse II abgespalten. Die Rezeptoren der MHC-Klasse II werden mit den Peptidfragmenten des Antigens beladen und schließlich stabil an der Oberfläche exprimiert [Lipscomb and Masten, 2002]. Die an der Oberfläche exprimierten Rezeptoren der MHC-Klasse II können durch Endozytose neu beladen werden. Es ist bekannt, dass die kostimulatorischen Rezeptoren (CD80, CD86, CD40, interzelluläre Adhäsionsmoleküle, ICAM) in Assoziation mit den Rezeptoren der MHC-Klasse II auf der Oberfläche exprimiert werden [Turley et al., 2000]. Im Vergleich zu Makrophagen, die auch Antigene mit den Rezeptoren der MHC-Klasse II präsentieren können, besitzen unreife DC mehr MIIC, wodurch ihre hohe Kapazität zur Antigenprozessierung hervorgerufen wird.

Im Proteasom werden Proteine zu kleineren Peptiden verdaut, die mit Hilfe des Proteins TAP (transporter associated with the antigen processing) in das endoplasmatische Reticulum (ER) gelangen. Hier werden sie mit Hilfe weiterer Proteine an die MHC-Klasse I Moleküle gebunden. Diese können in exozytischen Vesikeln zur Oberfläche gebracht und dort stabil exprimiert werden. Der Weg von der Prozessierung eines Proteins zur Präsentation in den Rezeptoren der MHC-Klasse I ist in fast allen Zellen des Körpers möglich, während die Prozessierung eines Proteins zur Präsentation in den Rezeptoren der MHC-Klasse II nur in Monozyten, Makrophagen, DC und B-Zellen möglich ist.

Die Antigenaufnahme führt zur Ausreifung der DC und zur Migration in lymphatische Organe, wo sie das Antigen den T-Zellen präsentieren können. Unreife DC besitzen Rezeptoren für inflammatorische Chemokine, die ihnen bei der Wanderung zu den Entzündungsherden helfen. Ausgereifte DC besitzen Rezeptoren für lymphoide Chemokine. Sie haben eine geringere bis keine Kapazität zur Aufnahme von Antigenen. Dafür exprimieren ausgereifte DC Rezeptoren der MHC-Klasse I und Klasse II stärker als unreife DC. Ausgereifte DC exprimieren außerdem die nötigen kostimulatorischen Rezeptoren, wie z. B. CD80,

CD86, CD40 und ICAM [Rattis et al., 1996, Romani et al., 1989].

Es gibt die These, dass Monozyten die Vorläufer der dermalen DC sind. Die Monozyten würden in die Haut einwandern und dort zu dermalen DC reifen, wie es in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Diese noch unreifen DC nehmen in der Epidermis und Dermis ein Antigen / Allergen auf und reifen aus zu APC. Dann wandern sie zu den Lymphgefäßen und weiter zum Lymphknoten und präsentieren, dort angekommen, das Antigen / Allergen den T-Zellen.

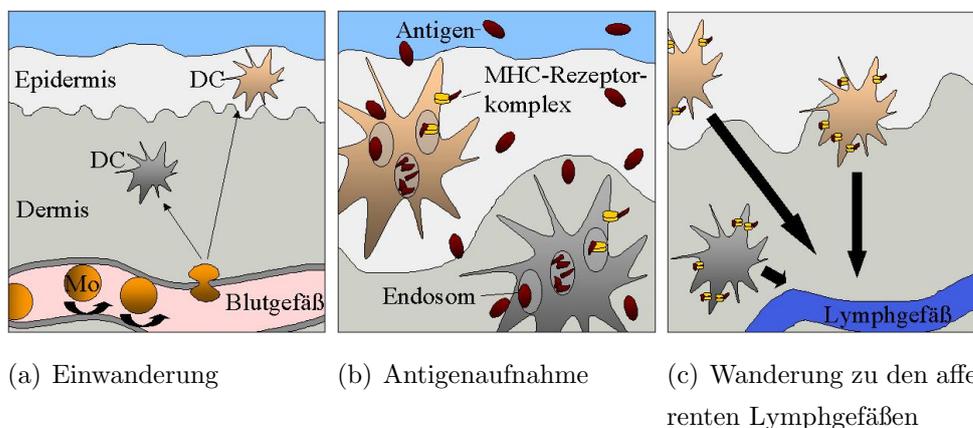


Abbildung 2.1: Schema der Einwanderung von Monozyten (Mo) aus dem Blutgefäß in die Haut und ihrer Reifung zu dermalen dendritischen Zellen (DC) (a), der Antigen- / Allergenaufnahme der DC (b) und anschließenden Wanderung der Antigen-präsentierenden DC in die afferenten Lymphgefäße, um von dort weiter in den Lymphknoten zuwandern, wo sie das Antigen den T-Zellen präsentieren (c).

Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass die DC *in vivo* die postulierte pro-inflammatorische Rolle einnehmen [van Rijt et al., 2005]. Sie sind nach einer Stimulation durch ein Allergen und dessen Prozessierung in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren. Weiterhin haben sie eine wichtige Rolle bei der Stimulation von Effektor-T-Zellen.

DC werden auf Grund ihrer Fähigkeit, T-Zellen aktivieren zu können, schon länger als mögliche Ziele für therapeutische Ansätze diskutiert. Eine mögliche Therapieoption wäre die Vakzinierung gegen Krebs [Lund-Johansen and Olweus, 1999]. Eine weitere Option wäre die gezielte Manipulation der DC, wodurch eine Ausheilung verschiedener heute nicht heilbarer Erkrankungen erreicht werden könnte [Lund-Johansen and Olweus, 1999].

In dieser Arbeit wurde mit zwei Subtypen der dendritischen Zellen gearbeitet, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

Langerhans Zellen

Langerhans Zellen wurden ursprünglich von P. Langerhans 1868 in der Haut entdeckt [Langerhans, 1868]. Er mißdeutete jedoch ihre Form und hielt sie für Nervenzellen. Anfang der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts wies Birbeck mit seinen Kollegen die nach ihm benannten Birbeck-Granula in den LC nach [Birbeck et al., 1961]. Auch heute noch werden Birbeck-Granula als Merkmal zur Identifikation von LC verwendet. Außerdem exprimieren von den dendritischen Zellen nur LC das Glycoprotein Langerin, das mit den Birbeck-Granula assoziiert ist, sowie E-Cadherin, das die Adhäsion der LC an Keratinozyten unterstützt [Kashihara et al., 1986, Tang et al., 1993]. LC weisen ein klares Zytoplasma, einen lobulären Kern und die Tennisschläger-förmigen Birbeck-Granula auf. Desweiteren fehlen ihnen Desmosome, Melanosome und die Granula der Merkel-Zellen [Novak et al., 2003a].

Bei immunhistologischen Untersuchungen der LC von Patienten mit AE zeigte sich, dass sie sehr stark CD1a-positiv und HLA-DR-positiv sind. Außerdem exprimieren sie den Rezeptor Fc ϵ RII, während CD1b nicht von LC exprimiert wird [Wollenberg et al., 1996, Wollenberg and Bieber, 1998, Wollenberg et al., 1999]. Desweiteren exprimieren LC die kostimulatorischen Rezeptoren CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sowie die Rezeptoren der MHC-Klasse I.

LC kommen in der Epidermis vor und bilden dort etwa 2-4% der gesamten Zellpopulation. Es wurde festgestellt, dass Frauen eine geringere Zellzahl an LC besitzen als Männer und dass die Population der LC mit dem Alter abnimmt.

Inflammatorische dendritische epidermale Zellen

Die inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) sind ein zweiter in dieser Arbeit behandelter Subtyp der dendritischen Zellen. Sie wurden das erste Mal 1996 von Wollenberg und seinen Kollegen beschrieben [Wollenberg et al., 1996]. Damals wurden sie als eine Subpopulation dendritischer Zellen in der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem charakterisiert.

Sie ähneln in ihrem äußeren Erscheinungsbild den LC, da sie wie diese ein klares Zytoplasma ohne Keratinfilamente und Melanosomen aufweisen. Im Unterschied zu den LC weisen sie keine Birbeck-Granula auf.

Zudem wurde bei den IDEC die Expression von CD1b, den α -Ketten der Integrine CD11a, CD11b und CD11c, des Thrombospondin Rezeptors (CD36) und des Mannose Rezeptors (CD206) nachgewiesen [Novak et al., 2003a].

Sowohl IDEC als auch LC können auf ihrer Oberfläche den hochaffinen Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI) sowie den niedrigaffinen Rezeptor (Fc ϵ RII/CD23) exprimieren. Jedoch wird Fc ϵ RI im Allgemeinen ohne die β -Kette exprimiert. Dadurch wird die Signaltransduktion des Rezeptors stark verringert [Novak et al., 2001b].

Wie die LC exprimieren die IDEC die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sowie die Rezeptoren der MHC-Klasse I und Klasse II auf ihrer Oberfläche [Wollenberg et al., 1996].

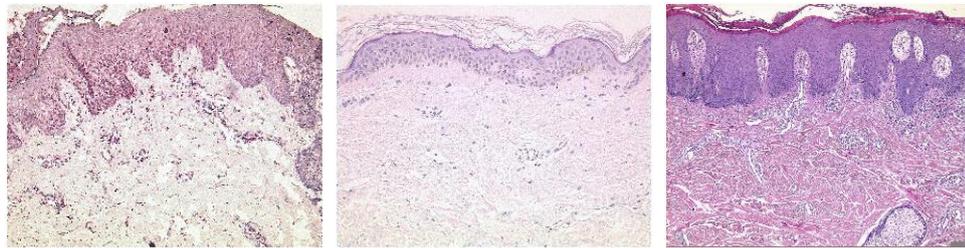
2.2 Atopisches Ekzem und Psoriasis vulgaris

Atopisches Ekzem (AE) und Psoriasis vulgaris (Pso) sind zwei der am weitesten verbreiteten Hauterkrankungen in den westlichen Industrienationen. Bei beiden Erkrankungen ist die Ursache bis heute nicht vollständig geklärt.

Anhand histologischer Schnitte von Hautbiopsien kann der Unterschied zwischen gesunder Haut und erkrankter Haut deutlich gemacht werden. In Abbildung 2.2 ist je eine charakteristische Färbung eines Schnittes einer Hautbiopsie dargestellt. Es sind sowohl die Epidermis als auch die Dermis zu erkennen. Die Epidermis der Patienten mit Pso ist deutlich dicker ausgeprägt als bei gesunder Haut. Zudem können entzündliche Infiltrate (blau gefärbte Zellen) in der Dermis und zum Teil auch der Epidermis bei beiden Patientengruppen nachgewiesen werden. Die Infiltrate bestehen aus Lymphozyten und monozytoiden Zellen.

2.2.1 Atopisches Ekzem

Atopisches Ekzem ist unter vielen Namen seit langer Zeit bekannt. Es wird z. B. Neurodermitis (Rost und Marchionini, 1932), Neurodermatitis, endoge-



(a) Haut AE

(b) Haut NA

(c) Haut Pso

Abbildung 2.2: Hautschnitt eines Patienten mit AE (a) und eines Patienten mit Pso (c) im Vergleich zur Haut eines gesunden Spenders (NA) (b) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. J. Wenzel, Universitätsklinikum Bonn)

nes Ekzem (Korting, 1954) oder atopische Dermatitis (Wise und Sulzberg, 1935) genannt. Häufig manifestiert sich ein atopisches Ekzem im Kindesalter der Patienten und wird im Laufe der Jahre milder, so dass etwa drei Viertel der Betroffenen nach Abschluss der Pubertät nur noch geringe oder keine Krankheitserscheinungen haben [Jung, 1995]. Diese chronische Erkrankung ist durch einen schubweisen Verlauf gekennzeichnet. Während eines Schubes entstehen entzündliche Herde in der Haut mit exzematösen, juckenden Hautveränderungen – vorzugsweise auf der Innenseite der Extremitäten aber auch auf dem gesamten restlichen Körper [Jung, 1995]. Desweiteren neigen diese Patienten stärker zur Ausbildung von Allergien als die restliche Bevölkerung. Das atopische Ekzem wird in eine intrinsische und eine extrinsische Form unterteilt [Leung and Bieber, 2003, Novak et al., 2003a]. Die extrinsische oder auch allergische Form betrifft etwa 80 % der erwachsenen Patienten. Sie wird von Sensibilisierungen gegen Umweltallergene geprägt. Bei diesen Patienten kann ein erhöhter IgE-Spiegel im Serum nachgewiesen werden [Novak et al., 2003a]. Die intrinsische Form hingegen tritt bei etwa 20 % der erwachsenen Patienten auf. Bei ihnen sind trotz entzündlicher Herde weder ein erhöhter IgE-Spiegel im Serum nachweisbar noch Sensibilisierungen gegen Umweltallergene. Patienten mit AE haben eine genetische Disposition, jedoch wird der Ausbruch der Erkrankung stark von weiteren Faktoren bestimmt, wie z. B. Umwelteinflüssen, Nahrungsmittelallergenen oder Stress.

Die Haut dieser Patienten ist zumeist trockener als gewöhnlich, was auf eine veränderte Lipid-Zusammensetzung des Stratum corneum zurückgeführt

wird. Dadurch kommt es zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust. Diese veränderte Lipid-Zusammensetzung führt auch zu einer verstärkten Durchlässigkeit für Allergene [Fartasch, 1997, Pastore et al., 2000]. Bei Patienten mit AE kommt es in ekzematösen und nicht beeinflussten Hautarealen zu einer Verschiebung des pH-Wertes in Richtung neutraler Werte [Gfesser et al., 1996]. Dadurch wird eine Besiedlung mit Mikroorganismen begünstigt.

Die Keratinozyten dieser Patienten zeigen eine anormale Produktion von Chemokinen und Zytokinen, wodurch verschiedene Leukozyten zu der Entzündung geleitet werden [Giustizieri et al., 2001]. Eine erhöhte Produktion verschiedenster Proteine der Signalübertragung führt zu einer verstärkten Produktion von GM-CSF, das Monozyten zur Einwanderung aus dem Blutgefäß in die Haut stimulieren kann [Girolomoni and Pastore, 2001, Kohno et al., 2004]. Zusätzlich produzieren die Keratinozyten größere Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$. Diese beiden Zytokine sind auch wichtig für die Migration der LC zum Lymphknoten [Cumberbatch et al., 1997]. Durch $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ kommt es zusätzlich zu einer Überexpression weiterer Zytokine und Chemokine, wie z. B. MCP-1, RANTES, Interleukin 10 (IL-10) und IL-8 [Pastore et al., 1997, Mascia et al., 2003]. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zytokin-Umgebung wichtig ist für die Aktivierung und Reifung der DC. Weitere Zytokine fördern die Wanderung der DC in die Lymphknoten und die Aktivierung von $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen durch die DC [Kakinuma et al., 2001].

Zur Bildung der primären $\text{T}_\text{H}2$ -Immunantwort trägt auch bei, dass in Leukozyten von Patienten mit AE eine erhöhte Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase festgestellt wurde [Hanifin and Chan, 1995]. Dies führt zu einer Reduzierung des intrazellulären cAMP und in der Folge zu einer gesteigerten Produktion von Prostaglandinen (PGE_2) durch Monozyten. PGE_2 wiederum unterdrücken eine $\text{T}_\text{H}1$ -Immunantwort und fördern die Sekretion von IL-4 durch $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen. Monozyten, LC und IDEC der Patienten mit AE besitzen drei Rezeptoren für die Bindung von IgE, den hochaffinen Rezeptor für IgE $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, den niedrigaffinen Rezeptor für IgE $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ (CD23) und das IgE-bindende Lektin Galektin-3. $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ist ein Tetramer ($\alpha\beta\gamma_2$), das in dieser Form normalerweise nur auf einigen Effektorzellen (wie den Mastzellen oder Basophilen) vorkommt. Auf APC

wird normalerweise eine Trimer-Form exprimiert, der die β -Kette fehlt, so dass die Signaltransduktion des Rezeptors stark verringert ist [Kraft et al., 1998, Bieber et al., 2000, Novak et al., 2001b]. Sowohl die Expression von $Fc\epsilon RI$ als auch $Fc\epsilon RII$ auf Monozyten des peripheren Blutes ist bei Patienten mit AE erhöht. Es wird vermutet, dass diese Monozyten die Vorläuferzellen der LC und IDEC sind. Die Kreuzvernetzung der Rezeptoren mit IgE bei Monozyten hat eine verstärkte Produktion des tolerogenen Zytokins IL-10 zur Folge, was wiederum den Phänotyp und die funktionellen Charakteristika der DC verändert [Novak et al., 2001a].

Nachdem ein Allergen in die Haut eingedrungen ist, kann es von LC aufgenommen werden. Sofern spezifisches IgE gegen das Allergen vorhanden ist, wird diese Aufnahme auch über den IgE-Rezeptor $Fc\epsilon RI$ der LC vermittelt. Das führt wiederum zu einer stärkeren Präsentation des Allergens in Rezeptoren der MHC-Klasse II. Dadurch kommt es zu einer optimalen Aktivierung der T-Zellen. Zusätzlich werden nach der Aktivierung der LC durch $Fc\epsilon RI$ Botenstoffe sezerniert, wie z.B. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, MCP-1, IL-16 und TARC, die weitere pro-inflammatorische Zellen ins Gewebe locken [Novak et al., 2001b, Novak et al., 2003a]. Es besteht die Hypothese, dass durch diese Chemokine in einer akuten Phase des AE $Fc\epsilon RI$ exprimierende Monozyten in die Haut einwandern, die dann zu IDEC differenzieren können. Diese IDEC wiederum exprimieren bei Patienten mit AE auch den $Fc\epsilon RI$ und sind nach Aufnahme eines Allergens besser als die LC in der Lage, T-Zellen zu aktivieren [Novak et al., 2004]. Die IDEC produzieren nach der Kreuzvernetzung des $Fc\epsilon RI$ IL-12 und IL-18. Dadurch kommt es zu einem Wechsel von einer T_H2 -Antwort zu einer T_H1 -Antwort [Novak et al., 2004, Nakanishi et al., 2001].

Makrophagen und Eosinophile werden durch IL-4 und IL-5 angeregt, in die Haut einzuwandern. Diese Zellen sezernieren wie die IDEC IL-12, was zusätzlich den Wandel der initiativen Immunantwort des T_H2 -Typ zu einer Immunantwort des T_H1 -Typ unterstützt. Auch von den Keratinozyten wurde beschrieben, dass sie IL-12 und IL-18 *in vivo* produzieren [Companjen et al., 2000]. Das von den T_H1 -Zellen produzierte $IFN-\gamma$ wird verantwortlich gemacht für den chronischen Verlauf der Erkrankung [Novak et al., 2001b, Novak et al.,

2003a]. Nach einer lokalen Behandlung der AE sind keine IDEC mehr in einer histologischen Färbung der Epidermis nachweisbar. Dies ist ein weiterer Ausdruck der besonderen Funktion der IDEC bei der AE [Wollenberg et al., 1996, Novak et al., 2002a, Novak et al., 2002b].

2.2.2 Psoriasis vulgaris

Psoriasis, auch Schuppenflechte genannt, ist geprägt von stark schuppenden, geröteten Entzündungsherden, die häufig auf der Außenseite der Extremitäten (insbesondere Ellenbogen und Knie) auftreten. Die Patienten, deren Zellen im Laufe dieser Arbeit untersucht wurden, leiden an einer Psoriasis vulgaris (Pso). Diese Form hat wie das AE einen chronischen Verlauf. Es sind häufig Handflächen, Fußsohlen oder die Kopfhaut betroffen, doch auch am ganzen restlichen Körper kann eine Pso auftreten.

Wie bei der AE hat die Pso eine genetische Disposition. Sie wird jedoch auch von weiteren Faktoren, wie Umwelteinflüssen oder Stress, beeinflusst. Häufig kommt es zu einer Erstmanifestation nach einer Infektion mit Streptokokken, z. B. durch *Streptococcus pyrogenes*, und kann durch weitere Streptokokken-Infektionen erneut provoziert werden [Jung, 1995].

Die Psoriasis vulgaris kann in zwei Typen unterteilt werden. Der Typ I ist gekennzeichnet durch eine frühe Erstmanifestation zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, einer positiven Familienanamnese für Pso, einer genetischen Disposition und tritt häufig nach einer Streptokokken-Infektion auf. Oft weisen diese Patienten einen erhöhten IgE-Spiegel im Serum auf. Der Typ II tritt eher zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr das erste Mal auf, ist häufig lokal begrenzt und verläuft meist milder als die Pso vom Typ I. Für die Pso des Typs II wurde bisher keine genetische Disposition beschrieben. Der IgE-Spiegel im Serum ist bei diesen Patienten meist normal. Beide Typen können sich zu einer Psoriasis arthritis entwickeln, bei der zusätzlich die Gelenke wie bei einer Arthritis betroffen sind [Ghoreschi and Roecken, 2003].

Noch Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Pso ausschließlich auf die Hyperproliferation der Keratinozyten zurückgeführt. Die stark gesteigerte Proliferation der Keratinozyten ist im histologisch angefärbten Schnitt der erkrankten Haut als deutliche Verdickung der Epidermis zu

sehen (s. Abbildung 2.2(c)). 1996 wurde das erste Mal nachgewiesen, dass die Pso durch T-Zellen ausgelöst wird. Dazu wurde gesunde Haut von Patienten mit Pso auf SCID-Mäuse transplantiert. Nach Injektion von autologen T-Zellen unter diese Haut kam es zur Bildung von Psoriasisplaques [Wrone-Smith and Nickoloff, 1996]. Im selben Modell wurde gezeigt, dass die Pso durch isolierte $CD4^+$ T-Zellen, nicht aber durch isolierte $CD8^+$ T-Zellen ausgelöst wird [Nickoloff and Wrone-Smith, 1999].

2004 wurde nachgewiesen, dass $CD8^+$ und $CD45RO^+$ T-Zellen bei Patienten mit Pso verstärkt in der Epidermis der äußeren Zone der Psoriasisplaques vorhanden sind [Vissers et al., 2004]. Es wird davon ausgegangen, dass die Zellen in der frühen Phase der Pso eine Rolle spielen. Die $CD8^+$ T-Zellen besitzen, wie die verstärkt in den Psoriasisplaques gefundenen $CD4^+$ T-Zellen, einen hochgradig repetitiven T-Zellrezeptor. Daher wird von der Proliferation einzelner aktivierter T-Zellen ausgegangen [Chang et al., 1994, Menssen et al., 1995]. Die $CD8^+$ T-Zellen können durch M-Proteine von Streptokokken zur Proliferation angeregt werden. Diese Proteine haben eine starke Sequenzhomologie zu Typ I Keratinen (wie Keratin 14, 16 und 17), die bei Entzündungen oder Traumata der Haut produziert werden [McGowan and Coulomb, 1998]. Bei Patienten mit Pso können die $CD8^+$ T-Zellen nicht nur mit den M-Proteinen aktiviert werden, sondern auch durch die Keratine [Valdimarsson et al., 1995]. Ein ähnliches molekulares Mimikry wurde bei Autoimmunerkrankungen beschrieben, weshalb die Pso von einigen Autoren ebenfalls als Autoimmunerkrankung bezeichnet wird [Wucherpfennig, 2001, Roep, 2002].

Als Mechanismus für die Pathogenese der Pso wird angenommen, dass es durch die Erkennung des Antigens im Rezeptorkomplex des MHC-Klasse I der Keratinozyten zu einer lokalen Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen kommt. Die von den Keratinozyten sezernierten Zytokine IL-15 und IL-17 regen diese $CD8^+$ T-Zellen zur Proliferation an. Die proliferierenden $CD8^+$ T-Zellen sezernieren $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$, was wiederum zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von DC führt. Die Zytokin-stimulierte Aktivierung der DC führt zu einer Typ I polarisierten Reifung der DC. Die DC sind in der Lage, große Mengen IL-12 zu produzieren [Mailliard et al., 2002]. Die DC phagozytieren verstärkt Antigene von apoptotischen Zellen aber auch von daneben liegen-

den lebenden Zellen [Harshyne et al., 2002, Ramirez and Sigal, 2001]. So erreichen sie die nötige Dichte des antigenbeladenen Rezeptorkomplex der MHC-Klasse II, um naive $CD4^+$ T-Zellen zu aktivieren. Die naiven $CD4^+$ T-Zellen differenzieren zu T_H1 -Zellen aus. Durch die Bindung der DC an den Liganden von CD40 können sie auch $CD8^+$ T-Zellen durch eine Kreuz-Präsentation des Antigens aktivieren [Ronchetti et al., 1999]. Die Kreuz-Präsentation zur Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen muss nicht zwangsweise im Lymphknoten stattfinden, sondern kann direkt in der Haut erfolgen.

Die von den aktivierten $CD8^+$ T-Zellen produzierten Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ regen die Keratinozyten zur Produktion und Sezernierung von IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, $TNF-\alpha$ sowie Wachstumsfaktoren an [Groene, 2002]. IL-12 und IL-18 wirken stimulierend auf DC. Von $CD4^+$ T-Zellen produziertes IL-17 verstärkt in Kombination mit $IFN-\gamma$ die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, die von den Keratinozyten gebildet werden. IL-6 und IL-8 verstärken die Einwanderung von T-Zellen in die Haut [Gudjonsson et al., 2004]. Die von diesen Zellen abgegebenen Zytokine (wie IL-3, IL-5, IL-8, IL-12, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$) regen die Proliferation der Keratinozyten weiter an. Weiterhin wird die Produktion von β -Defensinen (antimikrobiellen Peptiden) durch Keratinozyten gefördert. Das lockt weitere neutrophile Granulozyten in die Epidermis sowie Makrophagen in die Dermis [Prinz, 2003]. Die Entzündung bekommt einen sich selbst fördernden Charakter. Vor allem durch die Abwesenheit von IL-4 wird von einer primär T_H1 vermittelten Erkrankung in der chronischen Phase ausgegangen.

2.3 Wahl des Zellsystems

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Phänotypisierung und der Vergleich von Monozyten und antigenpräsentierenden Zellen der Haut bei AE und Pso. Die 1996 das erste Mal beschriebene Subpopulation dendritischer Zellen (IDEC) kommt nur in der entzündeten Haut vor und nicht in gesunder Haut [Wollenberg et al., 1996]. Im Interesse der vorliegenden Arbeit steht die nähere Charakterisierung dieser Subpopulation im Vergleich zu den LC. Da beide Subpopulationen nur einen kleinen Prozentsatz der Zellen in der Haut ausma-

chen, ist die Verfügbarkeit originärer Zellen stark beschränkt und limitiert die Anwendbarkeit immunologischer und proteinbiochemischer Methoden. Zudem sind die Zellpopulationen durch eine Isolierung aus der Haut nur schwer in der nötigen Reinheit zu erhalten. Zusätzlich sind die dendritischen Zellen, die aus der menschlichen Haut isoliert werden, einer Differenzierung zu reifen DC unterworfen. Man kann daher nur für eine kurze Zeit über unreife dendritische Zellen verfügen.

Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, beide Subpopulationen auf einem anderen Weg zu erhalten, damit genügend unreife DC für die verschiedenen Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die so erhaltenen DC sollten noch die Fähigkeit besitzen, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. Es ist länger bekannt, dass humane Monozyten bei der *in vitro* Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen Mo-DC differenzieren [Sallusto and Lanzavecchia, 1994]. Jedoch können diese Mo-DC ein anderes Expressionsmuster einiger Oberflächenmoleküle im Vergleich zur *in vivo* Situation zeigen. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol bzw. TGF- β gelang es, die Mo-DC zu einer IDEC-ähnlichen bzw. LC-ähnlichen Population heranreifen zu lassen. Beide Subpopulationen können so aus Monozyten des peripheren Blutes kultiviert werden und entsprechen in ihren Charakteristika den LC und IDEC in der Haut [Novak et al., 2004].

2.4 Oberflächenrezeptoren

Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedenste Proteine, durch die sie mit Ihrer Umwelt in Kontakt treten können. Ein Teil dieser Proteine sind Rezeptoren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren können die Zellen aktiviert werden und / oder an andere Zellen adhären. Auch Signale können durch diese Rezeptoren verstärkt werden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Rezeptoren untersucht, die der Adhäsion und Migration der Zellen dienen oder bei der Aktivierung der Zellen eine Rolle spielen. Daher soll hier auf einige dieser Rezeptorklassen näher eingegangen werden.

In Abbildung 2.3 ist schematisch dargestellt, wie Zellen aus dem Blutstrom in ein Gewebe einwandern. Zuerst treten Selektine mit ihren Liganden in Wechsel-

wirkung, wodurch es zu einer Verlangsamung der Zelle relativ zum Blutstrom kommt. Dieser Zustand wird auch als Rollen der Zellen auf den Epithelzellen bezeichnet. Anschließend können weitere Oberflächenrezeptoren (wie die Integrine) mit ihren Liganden auf den Endothelzellen interagieren, wodurch es zu einer stabilen Adhäsion an den Endothelzellen kommt und schließlich zur Diapedese der Zelle aus dem Blutstrom in das Gewebe hinein.

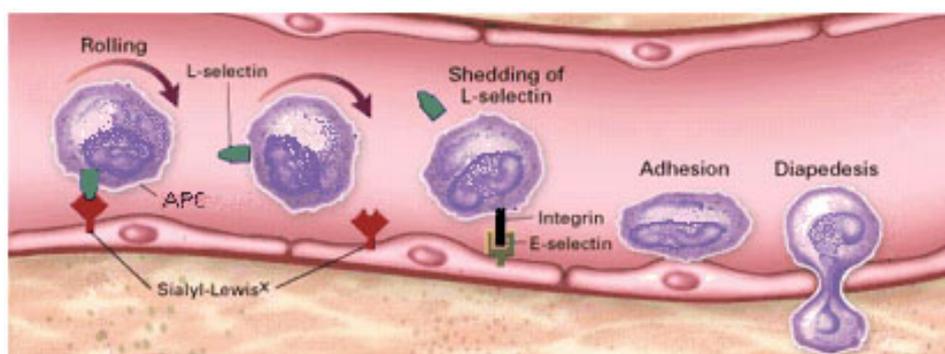


Abbildung 2.3: Interaktionen, die erst zum Rollen, anschließend zur Adhäsion und schließlich zur Diapedese von Zellen aus dem Blutstrom führen.
nach [Delves and Roitt, 2000]

2.4.1 Selektine

Die Selektine CD62E, CD62L und CD62P vermitteln adhäsive Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Sie bewirken, dass Zellen von den Blutgefäßen in das umgebende Gewebe und die Lymphknoten einwandern können.

Der Rezeptor CD62L (L-Selektin) wird auf Leukozyten exprimiert. Die Hauptliganden von CD62L sind die sulfatisierten Sialyl-Lewis x-Anteile der vaskulären Adressine CD34 und GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), die auf allen Endothelzellen, besonders stark jedoch von Lymphknotenvenolen mit hohem Endothel exprimiert werden [Schwarz and Alon, 2004, Berg et al., 1991]. Die Bindung von CD62L an die Adressine fördert ein Entlangrollen der Leukozyten an der Wand postkapillärer Venolen mit hohem Endothel und spielt eine wichtige Rolle bei der Zielortbestimmung der Zellen. Die Avidität von CD62L wird stark durch die umgebende

Strömungsgeschwindigkeit beeinflusst [Dwir et al., 2003]. Im Gegensatz dazu hängt die Avidität von CD62E und CD62P nicht von der Strömungsgeschwindigkeit ab. Die Bindung von CD62L scheint umso stärker, je höher die Durchflussrate ist. Es wird angenommen, dass CD62L Dimere bildet, die zum Anheften („Tethering“) und zum Rollen der Zellen führen [Schwarz and Alon, 2004]. Insgesamt ist die Bindungsdauer von CD62L an seine Liganden kurz. Sie ist jedoch wichtig für die Ausbildung weiterer Wechselwirkungen der anderen beiden Selektine CD62E und CD62P. Desweiteren ist die Spaltung der Ectodomäne des CD62L vor der Diapedese wichtig, da sonst die Zellen nur vermindert einwandern [Smalley and Ley, 2005].

CD62P (P-Selektin) und CD62E (E-Selektin) dagegen werden auf dem vasculären Endothel exprimiert und binden an Sialyl-Lewis x-Einheiten auf Leukozyten. Sie spielen zusammen mit den Integrinen unter anderem bei der Extravasation von Leukozyten eine Rolle.

2.4.2 Integrine

Jedes Integrin ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, das durch nichtkovalente Bindungen stabilisiert wird. Jede Untereinheit ist aus drei Abschnitten aufgebaut: einem C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt, einem einfach membrandurchspannenden Abschnitt und einem großen extrazellulären N-terminalen Abschnitt, der bis zu 90% des Moleküls ausmacht. Eine zusammenfassende Übersicht über die Struktur und die Signalleitung der Integrine wurde von Berman und seinen Kollegen veröffentlicht [Berman et al., 2003]. Derzeit sind 18 α - und 8 β -Ketten bekannt. Doch nicht jede mögliche Kombination der beiden Partner wird exprimiert. Daher werden die Heterodimere in Abhängigkeit von ihrer β -Kette in verschiedene Klassen eingeteilt. Derzeit sind 24 exprimierte Heterodimere bekannt. Eine Tabelle mit den bekannten resultierenden Heterodimeren aus den in dieser Arbeit untersuchten α - und β -Ketten befindet sich im Anhang auf S. XIV.

Das molekulare Gewicht der α -Ketten variiert zwischen 120 kD und 180 kD. Jede α -Kette besitzt an ihrem N-terminalen Ende sieben Wiederholungen einer homologen Domäne (Domäne I - VII), deren sekundäre Struktur eine Ähnlichkeit zu Ca-bindenden Motiven einiger Kalzium-bindender Proteine auf-

weist und auch EF-Hand-Motiv genannt wird. Die α -Ketten der Kollagenspezifischen Integrine CD49a/CD29 und CD49b/CD29 sowie die α -Ketten der β_2 -Integrine, die auf Leukozyten exprimiert werden, besitzen zwischen der zweiten und dritten wiederholten Domäne zusätzlich eine eingefügte Domäne. Diese Domäne wird I-Domäne genannt (engl: insertion domain). Sie enthält etwa 200 Aminosäuren [Leitinger and Hogg, 2000]. Die I-Domäne enthält eine konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindungsstelle, die auch als Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) bezeichnet wird [Lee et al., 1995]. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus etwa 20 - 50 Aminosäuren und unterscheidet sich stark zwischen den verschiedenen α -Ketten, wodurch die verschiedenen Funktionen der Heterodimere zustande kommen.

Das molekulare Gewicht der β -Ketten variiert zwischen 95 kD und 117 kD. Sie besitzen eine geringere Variabilität als die α -Ketten. β -Ketten besitzen wie die α -Ketten eine MIDAS-Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, die etwa 100 Aminosäuren vom aminoterminalen Ende der extrazellulären Domäne entfernt liegt. Da die Bindungsstelle Ähnlichkeiten zur I-Domäne der α -Ketten aufweist, wird sie auch I-ähnliche Domäne genannt. Eine weitere Charakteristik der β -Ketten ist eine Cystein-reiche Region, welche sich etwa 80 Aminosäuren von der I-ähnlichen Domäne in Richtung des carboxyterminalen Endes befindet. Die zytoplasmatischen Domänen der β -Ketten variieren zwischen 15 und 65 Aminosäuren (einzige Ausnahme CD104 / β_4 hat über 100 Aminosäuren) und sind stärker konserviert als bei den α -Ketten. Alle zytoplasmatischen Domänen der β -Ketten besitzen eine konservierte HDRR-Sequenz in der Nähe der Plasmamembran, die mit der konservierten GFKR-Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne der α -Ketten interagieren kann und so zur Bildung der Heterodimere beiträgt [Berman et al., 2003].

Während Selektine durch die Wechselwirkungen mit ihren Liganden die relative Geschwindigkeit von Leukozyten zur Blutströmung reduzieren können, kommt es durch die Interaktion der Integrine mit ihren Liganden zur Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen des Blutgefäßes [Laudanna, 2005]. Bisher ging man davon aus, dass gelöste Chemokine im Blutstrom sowie das Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen und die Interaktion mit den dort gebundenen Chemokinen zu einer Aktivierung der Integrine führt, bis ein Schwellen-

wert der Aktivierung überschritten ist und die Wechselwirkung der Integrine mit ihren Liganden zur Adhäsion führt. Diese Hypothese hat den Nachteil, dass eine Zelle im Blutstrom nur lange genug rollen müßte, um genügend aktiviert zu werden und um schließlich zu adhären [Laudanna, 2005]. Kürzlich konnte für CD11a/CD18 ein neues Modell bestätigt werden, nach dem der Aktivierungszustand nur durch die Konformation des Integrins bestimmt wird [Shamri et al., 2005]. Die Konformation ist durch gebundene, nicht aber durch gelöste Chemokine beeinflussbar. Wird die Konformation durch gebundene Chemokine und damit durch ein „inside-out“ Signal aus dem niedrigaffinen in einen mittelaaffinen Zustand überführt, kann CD11a/CD18 an seinen Liganden ICAM-1 binden. Das kann wiederum zu einem „outside-in“ Signal führen, das den Übergang des Integrins in eine hochaffine Konformation fördert. Die Bindung des Integrins an ICAM-1 in der hochaffinen Konformation ist so stark, dass es zu einer Adhäsion der Zellen in kürzester Zeit (≤ 1 s) kommt [Shamri et al., 2005].

Außer dem Einfluss der Integrine bei der Regulation des Auswanderns von Leukozyten in entzündetes Gewebe und ihrer Wanderung durch das Gewebe spielen Integrine eine Rolle bei der Phagozytose. Einige Integrine sind in der Lage, an opsonierende Komplementfragmente zu binden [Hogg et al., 2003]. Weiterhin sind Integrine bei der Bildung der immunologischen Synapse zwischen APC und T-Zellen beteiligt [Sims and Dustin, 2002].

Es gibt verschiedene Oberflächenproteine sowie intrazelluläre Proteine, mit denen einzelne Integrine interagieren können [Hemler, 1998]. Für viele Integrine sind nichtkovalente Interaktionen mit Tetraspaninen beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass zumeist die größere extrazelluläre Domäne der Tetraspanine mit der extrazellulären Domäne einer α - oder β -Kette in Wechselwirkung tritt. Dadurch gelangen intrazelluläre Proteine in räumliche Nähe zu den Integrinen, die für die Signalübertragung in die Zelle hinein wichtig sind (z. B. Phosphatidylinositol 4 Kinasen, PI4K oder Proteinkinase C, PKC). Es werden nichtkovalente Bindungen einiger Integrine mit Proteinen der Ig-Superfamilie (CD47 und CD147) und mit weiteren Proteinen (wie CD46 und CD36) beschrieben [Hemler, 1998].

2.4.3 Tetraspanine

Tetraspanine sind Glykoproteine, die vier Membran-durchspannende Domänen besitzen, woher sich auch ihr Name ableitet. Sie wurden früher der TM4SF-Familie (transmembrane four super-family) zugeordnet. Seit 1990 werden sie als eigenständige Familie geführt, da von verschiedenen Forschergruppen Sequenzhomologien sowie einige konservierte Peptidstrukturen nachgewiesen werden konnten [Hotta et al., 1988, Wright et al., 1990, Oren et al., 1990, Classon et al., 1989].

Tetraspanine kommen auf allen Zellen im menschlichen Körper vor. Derzeit sind 32 verschiedene Tetraspanine bekannt. Einige von ihnen werden von vielen verschiedenen Zellen exprimiert (z. B. CD9 oder CD81), andere haben sehr spezielle Funktionen (Peripherin/RDS oder Rom-1). Einige Tetraspanine werden nur auf der Oberfläche exprimiert (z. B. CD9) während andere sowohl auf der Oberfläche als auch in Endosomen (z. B. CD63 und CD151) vorkommen [Boucheix and Rubinstein, 2001, Karamatic Crew et al., 2004].

Tetraspanine besitzen eine kurze C- und N-terminale intrazelluläre Domäne und zwei extrazelluläre Schleifen (EC1 und EC2), die durch eine kurze zytoplasmatische Domäne getrennt sind (s. Abb. 2.4). In der größeren extrazellulären Domäne (EC2) können Disulfid-Bindungen ausgebildet werden. Dadurch werden die Tetraspanine in weitere Untergruppen eingeteilt. Diese Disulfid-Bindungen teilen die EC2 außerdem in eine konstante Region, an der es zu einer Dimerisierung kommen kann, und eine variable Region, mit der sie mit anderen Proteinen interagieren können. An den intrazellulären Domänen können sie mit Proteinen zur Signaltransduktion (wie PKC oder PI 4K) interagieren [Levy et al., 1998, Hemler, 2003].

Tetraspanine können auf den Zellen des Immunsystems mit verschiedenen Rezeptoren interagieren, wie z. B. CD81 im kostimulatorischen Komplex des B-Zellrezeptors. Da sie aggregieren können, haben sie die Fähigkeit, eine Anhäufung („Cluster“) mit verschiedenen Rezeptoren aufzubauen. Diese Anhäufungen werden auch Tetraspanin-Web genannt [Hemler, 2003]. In diesen Anhäufungen können verschiedene Rezeptoren zusammen gebracht und ihre Signale dadurch verstärkt werden. Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass Tetraspanine ein Signal negativ regulieren [Wright et al., 2004]. Die

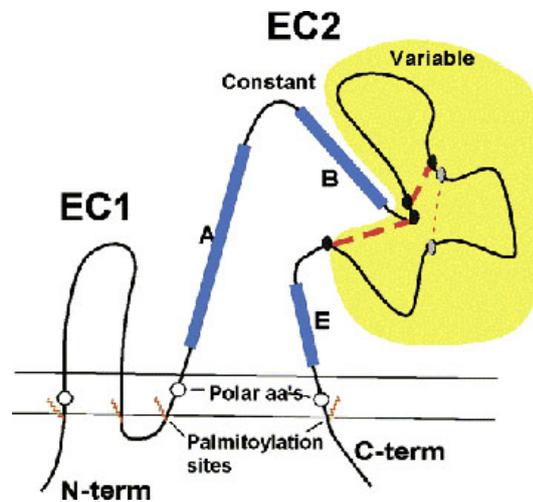


Abbildung 2.4: Schema des Tetraspanins CD81. Schematisch dargestellt ist die Aminosäurekette mit ihrem Verlauf durch die Membran. Mit A, B und E beschriftet und in blau gezeichnet sind drei Helizes, rot gestrichelt sind die Disulfid-Brücken. nach [Hemler, 2003]

Wechselwirkungen im Tetraspanin-Web werden in unterschiedliche Gruppen (primäre, sekundäre und tertiäre Wechselwirkungen) eingeteilt, je nachdem wie resistent sie in Detergenzien sind [Hemler, 2003, Tarrant et al., 2003, Wright et al., 2004, Levy and Shoham, 2005].

Die Wechselwirkungen im Tetraspanin-Web werden durch die Einwirkung von Detergenzien zumeist gänzlich aufgehoben, während sie gegen eine Cholesterol Depletion resistent sind [Yang et al., 2002, Stipp et al., 2001, Claas et al., 2001, Berditchevski et al., 2002].

2.5 Cytohesin-1

Cytohesin-1 ist der erste Vertreter der Cytohesin-Familie, der näher charakterisiert wurde. Mittlerweile sind außerdem Cytohesin-2 (ARNO), Cytohesin-3 (ARNO3; GRP-1) und Cytohesin-4 beschrieben worden. Den Proteinen der Cytohesin-Familie wird unter anderem die Regulation der β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion zugeschrieben [Kolanus et al., 1996, Kolanus and Zeitlmann, 1998]. Cytohesin-1 wurde ursprünglich als cDNA-Klon (B2-1) aus natürlichen Killerzellen und peripheren T-Zellen extrahiert [Liu and Pohajdak, 1992]. Damals wurde bei diesen Zellen eine Homologie zu dem Sec7-Protein

aus Hefe festgestellt. Durch die Verwendung der „Yeast-Two-Hybrid“-Methode konnte eine Funktion von Cytohesin-1 als Regulator der β_2 -Integrin vermittelten Zelladhäsion beschrieben werden [Kolanus et al., 1996].

Allen vier Cytohesin-Mitgliedern ist ihre stark konservierte Domänenstruktur gemeinsam. Sie besitzen eine coiled-coil-, eine Sec7-, eine Pleckstrin-Homologie- (PH-) und eine polybasische C-terminale- Domäne (s. Abbildung 2.5). Alle vier Vertreter der Cytohesin-Familie bestehen aus etwa 400 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa.

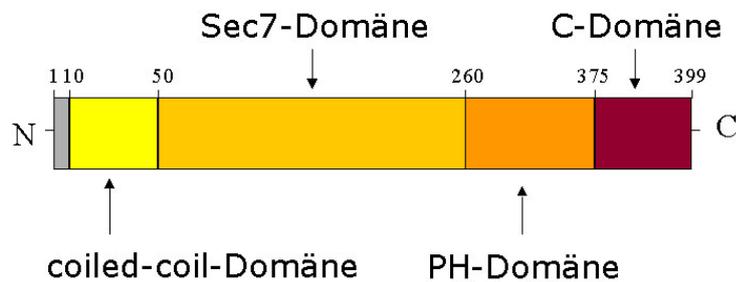


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von Cytohesin-1. Farblich unterlegt und markiert sind die coiled-coil-Domäne, die Sec7-Domäne, die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne und die polybasische C-Domäne. Die kleinen Zahlen über der schematischen Darstellung geben die Aminosäurenummer wieder.

Mit Hilfe der coiled-coil-Domäne kann Cytohesin-1 mit dem Protein CYTIP in Wechselwirkung treten [Boehm et al., 2003]. Es wird angenommen, dass die coiled-coil-Domäne bei der Dimerisierung des Cytohesin-1 eine Rolle spielt [Moss and Vaughan, 2002].

Die Cytohesin-Gruppe gehört zur Familie der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF). Die Sec7-Domäne des Cytohesins ist für die GEF-Aktivität an ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARF, hier speziell ARF1 und ARF6) zuständig [Chardin et al., 1996, Meacci et al., 1997, Knorr et al., 2000, Weber et al., 2001]. ARF-Proteine sind eine eigenständige Gruppe innerhalb der Supergenfamilie der Ras-GTPasen. Sie sind monomere G-Proteine und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Vesikeltransportes in eukaryotischen Zellen [Balch et al., 1992, Tsai et al., 1987]. ARF-Proteine sind in ihrer inaktiven Form GDP-gebunden und in ihrer aktiven Form GTP-gebunden. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der ARF-Proteine wird die Hydrolyse des ge-

bundenen GTP-Nukleotids katalysiert. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) können die GTP-Hydrolyse beschleunigen. Durch GEF-Proteine wird der umgekehrte Prozess katalysiert, da sie die Dissoziation des GDP-Nukleotids von ARF beschleunigen. An die Sec7-Domäne bindet auch die zytoplasmatische Domäne der β_2 -Kette der Integrine [Kolanus et al., 1996]. Hierbei sind die Membran-nahen Aminosäuren W723, K724 und A725 der Integrin-Kette für die Bindung an Cytohesin-1 essentiell [Geiger et al., 2000].

An die PH-Domäne kann Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP_3) gebunden werden. Dadurch erfolgt der Transport von Cytohesin-1 an die Plasmamembran. Diese Bindung von Cytohesin-1 an PIP_3 wird durch die polybasische C-Domäne verstärkt [Nagel et al., 1998b, Nagel et al., 1998a].

Außerdem wird vermutet, dass durch die Phosphorylierung der C-Domäne die Assoziation von Cytohesin-1 an das Actin-Skelett der Zelle reguliert wird [Dierks et al., 2001].

Trotz der starken Sequenzhomologien, die die vier Vertreter der Cytohesin-Familie aufweisen, konnte gezeigt werden, dass sie nicht redundant in den Zellen vorkommen [Theis et al., 2004].

Durch die Bindung von Cytohesin-1 an die β_2 -Kette kann die Affinität von LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$) an seinen Liganden ICAM-1 reguliert werden [Kolanus et al., 1996]. Die regulatorische Funktion von Cytohesin-1 auf LFA-1 wurde mit Hilfe einer dominantnegativen Mutante von Cytohesin-1 (Cytohesin-1 E157K) untersucht [Knorr et al., 2000]. Diese Mutante hat keine GEF-Aktivität mehr, da die katalytische Domäne durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert wurde. Dadurch konnte untersucht werden, ob die Regulation der Bindung von CD11a/CD18 an seinen Liganden ICAM-1 von der GEF-Aktivität des Cytohesin-1 beeinflusst wird. Cytohesin-1 E157K ist in der Lage, LFA-1 zu aktivieren. Jedoch wurde die Wechselwirkung von CD11a/CD18 mit ICAM-1 inhibiert [Geiger et al., 2000]. Die Überexpression von Cytohesin-1 E157K führte zu einer Reorganisation des Actin-Zytoskeletts [Mayer et al., 2001].

Es wird auch diskutiert, dass Cytohesin-1 an einem „outside-in“-Signalweg beteiligt ist, durch den es zu einer Aktivierung von T-Zellen kommt [Perez et al., 2003]. Hierbei würde die Aktivierung von CD11a/CD18 durch ICAM-2 und

ICAM-3 zu einer Aktivierung der GTPase-Aktivität von Cytohesin-1 führen. Dadurch wird Erk 1/2 phosphoryliert und aktiviert. Erk 1/2 aktiviert wiederum den Transkriptionsfaktor AP-1, was zu einer erhöhten Produktion von IL-2 führt. Zusätzlich wird durch Erk 1/2 die Transkription von IFN- γ erhöht. Die erhöhten Konzentrationen von IL-2 und IFN- γ induzieren eine Differenzierung der naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen.

3 Zielsetzung

Die Pathomechanismen des atopischen Ekzems (AE) und der Psoriasis vulgaris (Pso) weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Monozyten und die sich daraus entwickelnden dendritischen Zellen (DC). Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, in welchem Maße sich migratorische Fähigkeiten, Signalübertragung und Antigen-/Allergenaufnahme und -präsentation von Monozyten, Langerhans Zellen (LC) und inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) unterscheiden.

Zu diesem Zweck wurden Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit AE, Pso und von gesunden Spendern isoliert und zu Mo-LC und Mo-IDEC kultiviert. Diese drei Zelltypen sollten auf die Expression von Selektinen und Integrinen als Oberflächenmarker für migratorische Fähigkeiten untersucht werden. Weiterhin sollte die Expression von Tetraspaninen als Oberflächenmarker für Signaltransduktionswege charakterisiert werden. Als Maßstab für die Antigen-/Allergenaufnahme und -präsentation der Monozyten sollte die Expression von Ig-Rezeptoren sowie Rezeptoren der MHC-Klasse I und MHC-Klasse II untersucht und verglichen werden.

Die erhaltenen Expressionsmuster haben *in vivo* einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen bei der Wanderung aus einer laminaren Strömung in umgebendes Gewebe. Um diesen Einfluss zu charakterisieren, sollten Adhäsionsversuche der Mo-LC und Mo-IDEC auf Endothelzellen in einer laminaren Strömung durchgeführt werden. Die Adhäsion der Zellen und die migratorischen Fähigkeiten werden auch von intrazellulären Proteinen gesteuert. Cytohesin-1 ist ein solches intrazelluläres Protein, dass die Affinität und Avidität des Integrins CD11a/CD18 beeinflusst. Es ist ebenfalls an der Signalübertragung von außen in die Zelle hinein beteiligt. In weiteren Versuchen sollte die Expression von Cytohesin-1 als Maß für die Affinität und Avidität des CD11a/CD18 in diesen drei Zelltypen näher betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen tieferen Einblick in die Pathomechanismen des AE und der Pso ermöglichen und neue Wege bei der Therapie der Erkrankungen eröffnen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

| | |
|---------------------------|--|
| Autoklaven | Varioklav 500; H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim |
| Chemilumineszenzdetektor | Intelligent Dark Box II mit Kamera LAS-1000; FujiFilm, Japan |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur; BD, Heidelberg |
| Entwicklermaschine | X-OMAT 5000 RA; Kodak, Japan |
| Heizblöcke | Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg |
| Heizrührgerät | MR3001; Heidolph, Schwabach |
| Immolute 2000 | DPC Biermann, Bad Nauheim |
| Inkubatoren | HeraCell; Heraeus (Kendro), Hanau |
| invertierendes Mikroskop | IMT-2; Olympus, Hamburg |
| Monovetten | (9 ml Volumen) mit EDTA-KE, Li-Heparin oder Serum-Gel; Sarstedt, Nümbrecht |
| Lichtmikroskop | Laborlux K; Leica, Solms |
| pH-Meter | pH526; WTW, Weilheim |
| Photometer | DU640; Beckman, Krefeld |
| Pipetten | P2, P20, P200, P1000; Gilson, Middleton, USA 5 ml, 10 ml, 25 ml Serological Pipet; Falcon (BD), Heidelberg |
| Pipettierhilfen | Swiftpet; Abimed, Langenfeld pipetus-Akku; Hirschman-Laborgeräte, Eberstadt pipetus-Standard; Hirschman-Laborgeräte, Eberstadt |
| Protein-Minigel-Apparatur | Miniprotean II; BioRad, München |

| | |
|----------------------------|--|
| Protein-Transfer-Apparatur | BioRad, München |
| Reinstwasseranlage | Millipore, Schwalbach |
| Sterilbänke | HeraSafe; Heraeus (Kendro), Hanau |
| Tischschüttler | Rocky; Schultheiss, München |
| Transformator | BluePower 500; Serva, Heidelberg |
| Video-Kamera | 3CCD; JVC, Japan |
| Videorekorder | SR L 900; JVC, Japan |
| Waagen | BP 6100, BP 110, BP211 D; Sartorius, Göttingen |
| Wasserbäder | 1002; GFL, Burgwedel |
| Zentrifugen | Multifuge 3L und 3S-R; Heraeus (Kendro), Hanau Biofuge fresco; Heraeus (Kendro), Hanau Allegra 6R- und GP-Centrifuge; Beckman Coulter, Krefeld |
| Zentrifugenrotoren | Heraeus (Kendro), Hanau PP4/96 3324; Heraeus (Sorvall), Hanau GH3.7; Beckmann Coulter, Krefeld |

4.1.2 Chemikalien

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 30 % | Serva, Heidelberg |
| 7-Aminoactinomycin D (7AAD) | Sigma, Taufkirchen |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Merck, Darmstadt |
| Aprotinin | Sigma, Taufkirchen |
| Bradford-Reagenzlösung | BioRad, München |
| Bromphenolblau | LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden |
| Dextran 500 | Sigma, Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma, Taufkirchen |

| | |
|--|---------------------------------------|
| Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA) | Sigma, Taufkirchen |
| Gentamicin | Sigma, Taufkirchen |
| Glyzerin | Sigma, Taufkirchen |
| Glycin | Serva, Heidelberg |
| Hepes | Sigma, Taufkirchen |
| Igepal CA630 | Sigma, Taufkirchen |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Leupeptin | Sigma, Taufkirchen |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl_2) | Merck, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol (β -Me) | Sigma, Taufkirchen |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid (NaN_3) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| Nycoprep | AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma, Taufkirchen |
| Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20) | Sigma, Taufkirchen |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma, Taufkirchen |
| Salzsäure (37 %) | Merck, Darmstadt |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma, Taufkirchen |
| Tris-(hydroxymethyl)amino-methan (Tris), Trisma-Base | Sigma, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |

4.1.3 Zelllinie, Zellkultur-Medien und Seren

a) Zelllinie

humane dermale mikrovaskuläre Epithelzellen (HDMEC) Promocell, Heidelberg

b) Medien und Seren

RPMI-1640 (very low endotoxine) Biochrom AG, Berlin

Hanks buffered salt solution Gibco (Invitrogen), Eggenstein

Antibiotikum/Antimykotikum Gibco (Invitrogen), Eggenstein

Fötale Kälber Serum (FKS), hitzeinaktiviert Sigma, Taufkirchen

Mausserum Dianova, Hamburg

4.1.4 Enzyme und Cytokine

rekombinantes IL-4 Stratmann Biotech, Hannover

rekombinantes IL-1 β Promocell, Heidelberg

rekombinantes GM-CSF Leucomax; Novartis, Basel, Schweiz

humanes TGF- β (Platelet derived) R and D Systems, Minneapolis, USA

4.1.5 Antikörper

primäre Antikörper

| Antikörper | Isotyp | Konjugation | Verdünnung | Klon | Herkunft |
|---|--------------|-------------|------------|----------|-----------------------------------|
| Maus-IgG1, κ | | nein | 1:200 (DF) | MOPC-21 | BD, Heidelberg |
| Maus-IgG2a, κ | | nein | 1:200 (DF) | G155-178 | BD, Heidelberg |
| Ratte-anti-Cytohesin-1 (2D7) | | nein | 1:20 (WB) | | E. Kremmer; GSF, München |
| Kaninchen-anti-Actin | | nein | 1:200 (WB) | | Sigma, Taufkirchen |
| Maus-anti-CD11a | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | HI11.1 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD11b | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | ICRF44 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD11c | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | B-ly6 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD41 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | HIP8 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD49a | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | SR84 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD49b | IgG2a (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 12F1-H6 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD49c | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | C3II.1 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD49d | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 9F10 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD49e | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | IIA1 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-hochaffiner Fc ϵ RI (22E7) | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | | Dr. rer nat. J. Kochan, USA |
| Maus-anti-CD23 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 9P.25 | Immunotech, Marseille, Frankreich |

WB: Western-Blot

DF: Durchflusszytometrie

| Antikörper | Isotyp | Konju- gation | Verdünnung | Klon | Herkunft |
|-----------------|-------------|------------------|------------|----------------|---------------------|
| Maus-anti-CD62E | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 68-5H11 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD62L | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | Dreg-56 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD62P | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | AC1.2 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD18 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | CR3/CR4 6.7 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD29 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | MAR4 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD61 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | RUU- PL7F12 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD104 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 450-9D | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD9 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | M-L13 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD37 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | M-B371 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD53 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | HI29 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD63 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | H5C6 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD81 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | JS-81 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD82 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | B-L2 | Acris; Hiddenhausen |
| Maus-anti-CD151 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 14A2.H1 | BD, Heidelberg |

WB: Western-Blot

DF: Durchflusszytometrie

| Antikörper | Isotyp | Konju- gation | Verdünnung | Klon | Herkunft |
|----------------------------|--------------|------------------|------------|-----------------|-------------------------------------|
| Maus-anti-MHC- Klasse-I | IgG1 (Maus) | nein | 1:30 (DF) | W6/32 | Prof. Dr. rer nat. N. Koch; Bonn |
| Maus-anti-HLA-DR | IgG1 (Maus) | nein | 1:30 (DF) | L243 | Prof. Dr. rer nat. N. Koch; Bonn |
| Maus-anti-CD74 | IgG2a (Maus) | nein | 1:200 (DF) | M-B741 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD83 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | HB15e | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD80 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | L307.4 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD86 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 2331(FUN- 1) | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD40 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 5C3 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD16 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 3G8 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD32 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 3D3 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD64 | IgG1 (Maus) | nein | 1:200 (DF) | 10.1 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD14 | IgG1 (Maus) | PE | 1:200 (DF) | MP9 | BD, Heidelberg |
| Maus-anti-CD1a | IgG1 (Maus) | PE | 1:200 (DF) | T6RD1 | Beckmann Coulter, München |

WB: Western-Blot

DF: Durchflusszytometrie

sekundäre Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Herkunft |
|---|-------------|---------------------------------|
| HRP-Ziege-anti-Ratte-IgG (gesamtes Molekül) | 1:3000 (WB) | Dianova, Hamburg |
| HRP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG (gesamtes Molekül) | 1:3000 (WB) | Sigma Biosciences, Missouri USA |
| FITC-Ziege-anti-Maus-IgG (F(ab') ₂ -Fragment) | 1:200 (DF) | Dianova, Hamburg |
| Ziege-anti-Maus-IgG (F(ab') ₂ -Fragment) | 1:1000 | Dianova, Hamburg |

WB: Western-Blot

DF: Durchflusszytometrie

4.1.6 IgE und FITC-gekoppeltes *Bet v 1*-Allergen

| | |
|--|------------------------------------|
| humanes Myeloma-IgE | Merck, Darmstadt |
| anti-IgE | Dako, Hamburg |
| humanes spezifisches IgE für <i>Bet v 1</i> | Prof. R. Valenta, Wien, Österreich |
| <i>Bet v 1</i> rekombinant (komplettes Allergen) | Prof. R. Valenta, Wien, Österreich |
| <i>Bet v 1</i> rekombinant (aa 1-74 des Allergens) | Prof. R. Valenta, Wien, Österreich |
| <i>Bet v 1</i> rekombinant (aa 75-106 des Allergens) | Prof. R. Valenta, Wien, Österreich |
| <i>Bet v 1</i> rekombinant (Trimer des Allergens) | Prof. R. Valenta, Wien, Österreich |

4.1.7 Proteinbiochemische Hilfsmittel

| | |
|------------------------------------|-------------------------|
| ECL-Reagenzien | Amersham, Braunschweig |
| ECL-Detektionsfilme | Amersham, Braunschweig |
| Einweg-Kulturplatten | Falcon (BD), Heidelberg |
| Einweg-Küvetten | Sarstedt, Nümbrecht |
| Filterpapier 3MM | Whatman, Brentford, UK |
| Hyperfilm TM MP | Amersham, Braunschweig |
| Nitrozellulosemembran (0,45 µm) | Amersham, Braunschweig |

Proteinstandard

Bei der Gelelektrophorese wurde als Protein-Längenstandard der High-Range Rainbow Molecular Weight Marker der Firma Amersham aus Braunschweig verwendet. Er enthält folgende Proteine:

| Protein (vorgefärbt) | Molekulargewicht in kDa |
|----------------------------|-------------------------|
| Myosin | 220,0 |
| Phosphorylase b | 97,0 |
| Rinder Serum Albumin (BSA) | 66,0 |
| Ovalbumin | 45,0 |
| Karbonische Anhydrase | 30,0 |
| Trypsin Inhibitor | 20,1 |
| Lysozym | 14,4 |

4.1.8 Wässrige Lösungen

| | |
|------------------------|---|
| PBS 10-fach (pH 7,4) : | 1,35 M NaCl |
| | 27 mM KCl |
| | 80 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O |
| | 15 mM KH ₂ PO ₄ |

| | |
|---|--|
| PBS-azid : | PBS 1-fach 0,5 % (w/v) BSA 0,01 % (w/v) NaN ₃ |
| Wasch-Puffer zur Monozyten- Isolation (1-fach): | 155 mM NaCl 4,5 mM EDTA 0,1 % (w/v) BSA |
| TBS 10-fach : | 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) 1,4 M NaCl |
| TBST 10-fach : | 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) 1,4 M NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20 |
| FACS-Puffer 10-fach : | 1,45 M NaCl 75 mM Na ₂ HPO ₄ 32,5 mM NaH ₂ PO ₄ 155 mM NaN ₃ 10 % (v/v) FKS |

4.2 Methoden

4.2.1 Einbezogene Personengruppen

In dieser Arbeit wurde mit Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit atopischem Ekzem (AE), Patienten mit Psoriasis vulgaris (Pso) und einer gesunden Kontrollgruppe, die weder atopisches Ekzemen, allergische Rhinitis, allergisches Asthma noch Psoriasis vulgaris in der Vorgeschichte hatten, gearbeitet. Die Probanden nahmen zum Zeitpunkt der Blutentnahme seit mindestens einer Woche keine systemischen Medikamente, die direkten Einfluss auf das Immunsystem haben (z. B. Kortison). Außerdem befanden sich die Probanden der beiden Krankheitsgruppen in einem akuten Krankheitsschub. Die Studie war von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt worden und

alle Patienten hatten die Einverständniserklärung zur Entnahme von Blut für wissenschaftliche Zwecke unterschrieben.

Die Patienten mit atopischem Ekzem oder einer Psoriasis vulgaris Typ I hatten einen hohen Wert des Gesamt-IgEs im Serum, während die Kontrollgruppe und die Gruppe mit Psoriasis vulgaris Typ II einen normalen Spiegel an Gesamt-IgE aufwiesen.

Tabelle 4.1: Einbezogene Personengruppen

| | AE | Pso | Kontrolle |
|---|----------------|---|-------------|
| Anzahl | $n = 40$ | $n = 65$ | $n = 50$ |
| männlich/weiblich | 19/21 | 31/34 | 22/28 |
| mittleres Alter in Jahren | 33 ± 13 | 50 ± 17 | 30 ± 7 |
| Intervall in Jahren | 14-68 | 23-81 | 22-56 |
| Serum-Gehalt an IgE in kIU/l | 1000 ± 800 | Typ I: 727 ± 589 Typ II: 54 ± 42 | 59 ± 94 |
| Serum-Gehalt an spez. IgE gegen <i>Bet v 1</i> in kU/l | 50 ± 51 | 12 ± 31 | 5 ± 19 |

4.2.2 Bestimmung des IgE im Serum

Um den IgE Gehalt im Serum der Probanden zu bestimmen, wurde Blut in einer Monovette mit Gel (Serum-Röhrchen) abgenommen und nach der vollständigen Gerinnung bei $1000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in den Routine-laboratorien der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Bonn auf den Gesamtgehalt an IgE sowie auf den Gehalt an spezifischem IgE gegen Birkenpollen (*Bet v 1*) mit Hilfe eines Immunoassays im Gerät Immulite 2000 untersucht.

Die verwendete Festphase zur Bindung des zu untersuchenden Stoffes waren spezielle antikörperbeschichtete Polystyrolkugeln. Nach der Inkubation der zu untersuchenden Serumprobe mit den Kugeln und einem Phosphatase-markiertem Reagenz, wurde überschüssige, ungebundene Probe durch Zentrifugation abgetrennt. Die Kugel mit der gebundenen Probe wurde viermal mit

einem Puffer gewaschen und anschließend ein Dioxethansubstrat hinzugegeben. Durch Reaktion des Chemilumineszenzsubstrates mit der an der Kugel gebundenen Alkaliphosphatase wird Licht emittiert. Die abgegebene Lichtmenge ist proportional zur Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen Analyse-substanz.

Die Ergebnisse der Analyse des Gesamtgehalts an IgE im Serum wurden in IU/ml angegeben. Diese Ergebnisse können wie folgt umgerechnet werden:

$$\text{Wert} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] \times 2,4 \longrightarrow \text{Wert} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] \quad (4.1)$$

$$\text{Wert} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] \times 1 \longrightarrow \text{Wert} \left[\frac{\text{kIU}}{\text{l}} \right] \quad (4.2)$$

Der Gesamtgehalt an IgE im Serum steigt im Kindesalter langsam an, bis er einen durchschnittlichen Wert für Erwachsene innerhalb des zweiten Lebensjahrzehnts erreicht. Ein deutlicher Anstieg über diesen Richtwert kann auf Allergien hindeuten, jedoch auch Patienten mit Myelomen, pulmonarer Aspergillose oder akutem Parasitenbefall haben einen erhöhten IgE-Spiegel. Als Richtwerte wurden im Alter zwischen 0 und 15 Jahren ein Wert unter 45 kIU/l und ab einem Alter von 15 Jahren ein Wert unter 150 kIU/l angenommen.

Die Ergebnisse der Analysen zum Gehalt des Serum an spezifischem IgE gegen *Bet v 1* wurden in kU/l angegeben. Zusätzlich wurden diese Werte in Klassen eingeteilt, die ein Hinweis auf die Menge endogen zirkulierender IgE-Antikörper sind. Die Einteilung ist in Tabelle 4.2 angegeben.

Tabelle 4.2: Klasseneinteilung für Einzelallergene

| Ergebnis in kU/l | Klasse | Reaktivität mit Einzelallergen |
|------------------|--------|--------------------------------|
| 0,00 - 0,34 | 0 | nicht vorhanden |
| 0,35 - 0,69 | 1 | niedrig |
| 0,70 - 3,49 | 2 | mittel |
| 3,50 - 17,49 | 3 | hoch |
| 17,50 - 52,49 | 4 | sehr hoch |
| 52,50 - 99,99 | 5 | sehr hoch |
| ≥100,00 | 6 | sehr hoch |

4.2.3 Anreicherung und Kultivierung von primären Zellen aus dem peripheren Blut

Anreicherung von Monozyten

Zum Anreichern von Monozyten wurde Nycoprep (Dichte: 1,0068 g/cm²) der Firma AXIS-SHIELD PoC AS mit einem modifizierten Protokoll für den Dichtegradienten verwendet [Novak et al., 2001a]. Dazu wurde EDTA-stabilisiertes Blut verwendet. Um die Erythrozyten und Lymphozyten zu sedimentieren, wurde dem Blut 1/10 (v/v) 8%-iges Dextran 500 (gelöst in einer 155 mM NaCl-Lösung) zugegeben. Da Monozyten gegenüber Lymphozyten eine höhere osmotische Resistenz aufweisen, können sie durch Zugabe von Dextran getrennt werden. Nach vorsichtigem Mischen und einer Inkubationszeit von etwa 45-60 min bei Raumtemperatur konnte das Plasma abgenommen und im Volumenverhältnis 2:1 über Nycoprep geschichtet werden. Um den Gradienten zu erzeugen, wurde die Blut-Nycoprep-Schichtung für 20 min bei 670 × g zentrifugiert. Die weiße Interphase wurde abgenommen und drei Mal mit einem Wasch-Puffer (s. S. 37) gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 140 × g). Anschließend wurde das Sediment in Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dem Medium für Monozyten (RPMI-1640, very low endotoxine) wurde vor dem Gebrauch 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum zugesetzt. Die Zellzahl wurde zur Kultivierung auf 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die CD14-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Kultivierung der Monozyten zu Mo-IDEC und Mo-LC

Die angereicherten Monozyten wurden nach den Beschreibungen von K. Reich und N. Novak kultiviert, um daraus DC reifen zu lassen, die den inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) und den Langerhans Zellen (LC) der Haut phänotypisch sehr ähnlich sind [Novak et al., 2002b, Novak et al., 2004, Reich et al., 2001]. Zur Verkürzung werden IDEC ähnliche- und LC ähnliche-Populationen, die aus Monozyten generiert wurden, im Folgenden Mo-IDEC und Mo-LC genannt. Zur Generierung von Mo-IDEC aus Monozyten wurden IL-4, GM-CSF und β -Mercaptoethanol (β -Me) nach der

Tabelle 4.3 verwendet. Die Zellen wurden dazu in 24-Loch-Platten mit 1 ml Zellsuspension je Loch bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Angaben in der Tabelle 4.3 beziehen sich auf die Zugabe je Loch.

Tabelle 4.3: Kultivierung von Mo-IDEC

| Tag 0 | Tag 2 | Tag 4 |
|-----------------|-----------------|------------------------|
| 500 U/ml IL-4 | 250 U/ml IL-4 | 250 U/ml IL-4 |
| 500 U/ml GM-CSF | 250 U/ml GM-CSF | 250 U/ml GM-CSF |
| 10 µM β-Me | 10 µM β-Me | 10 µM β-Me |
| | | 500 µl frisches Medium |

Die Zugabe von β-Mercaptoethanol stellt eine alternative Methode zur Generierung FcεRI-positiver DC gegenüber älteren Beschreibungen dar. In diesen älteren Beschreibungen wurde chimäres oder Myeloma-IgE dem Medium zugesetzt. Die Bindung des IgE an die IgE Rezeptoren ist in der Lage, den Rezeptor auf der Oberfläche der DC zu stabilisieren [Novak et al., 2003b]. Das β-Me übernimmt in dieser Art der Kultivierung eine ähnliche Funktion. Da die γ-Einheit des IgE Rezeptors aus zwei über Disulfid-Brücken kovalent verbundenen γ-Ketten besteht, nimmt man an, dass die Zugabe reduzierender Substanzen (wie β-Me), die Bindungskapazität erhöht und damit den Anteil an vorhandener γ-Kette, die für die Assoziation der α-Kette notwendig ist, erhöht [Novak et al., 2002b]. Dieses Modell ist vor allem für funktionelle Untersuchungen FcεRI-positiver DC geeignet.

Zur Reifung von Mo-LC aus Monozyten wurden IL-4, GM-CSF und humanes TGF-β laut Tabelle 4.4 verwendet. Die Zellen wurden dazu in 24-Loch-Platten mit 1 ml Zellsuspension je Loch bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Angaben in der Tabelle 4.4 beziehen sich auf die Zugab je Loch.

Nach sieben oder acht Tagen wurden die unreifen DC für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

Tabelle 4.4: Kultivierung von Mo-LC

| Tag 0 | Tag 2 | Tag 4 |
|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| 500 U/ml GM-CSF | 250 U/ml GM-CSF | 250 U/ml GM-CSF |
| 25 U/ml TGF- β | 25 U/ml TGF- β | 25 U/ml TGF- β |
| 500 U/ml IL-4 | | 500 μ l frisches Medium |

4.2.4 Stimulation von Zellen

Die Mo-IDEC und Mo-LC wurden mit Myeloma-IgE und anti-IgE-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die IgE-vermittelte Stimulation auf die Expression einiger Proteine hat. Myeloma-IgE kann sowohl an den niedrigaffinen Rezeptor Fc ϵ RII/CD23 als auch an den hochaffinen Rezeptor Fc ϵ RI binden. Durch die Bindung von IgE an diese Fc-Rezeptoren kann es zu einer Kreuzvernetzung der Rezeptoren kommen. Dies führt zu einer IgE-vermittelten Antigenpräsentation. Bindungsstudien zeigten, dass durch Zugabe der hier verwendeten Konzentration des Myeloma-IgEs hauptsächlich eine Bindung des IgE an Fc ϵ RI stattfindet [Novak et al., unveröffentlichte Daten]. Zur Stimulation wurden die Mo-IDEC und Mo-LC gezählt und einmal mit frischem Medium ohne FKS und Antibiotikum/Antimykotikum gewaschen. Die Zellzahl wurde mit RPMI-1640 (very low endotoxine) auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Alle folgenden Schritte fanden bei 37°C statt. Die Zellsuspension wurde auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Eine Hälfte der Suspension wurde als Kontrolle nicht weiter behandelt. Der anderen Hälfte wurde 1 μ g/ml Myeloma-IgE zugesetzt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend in 5 ml frischem Medium aufgenommen und zentrifugiert (Zentrifugation: $315 \times g$, 5 min). Zur Kreuzvernetzung des IgE wurde den Zellen 4 μ g/ml polyklonaler anti-IgE-Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden eine Stunde inkubiert und anschließend in 5 ml frischem Medium aufgenommen und zentrifugiert. Danach wurden die Zellen nochmals für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die so behandelten Zellen wurden sofort auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Ein Teil der Probe wurde als Sediment („Dry Pellet“) eingefroren, um den Nachweis der Expression von Cytohesin-1 mittels Western-Blot Techniken zu einem späteren

Zeitpunkt durchzuführen.

4.2.5 Funktionsanalysen

Adhäsionsversuche unter laminaren Strömungsbedingungen

Zur Untersuchung der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit verschiedener Zellpopulationen werden häufig statische Versuchsaufbauten verwendet, wie z. B. die Adhäsion an immobilisierten Liganden. Migrationsversuche in Richtung eines Gradienten eines Chemokins in Transwells ist ein weiterer weitverbreiteter Versuchsaufbau. Dabei kann man Aussagen über die Stärke der Adhäsionsbeziehungweise Migrationsfähigkeit erhalten. Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch der starke Modellcharakter. Selten werden in einem Organismus die Zellen mehrere Minuten oder Stunden Zeit haben, eine Bindung über Integrine und Selektine aufbauen zu können, um dann zu wandern. Vielmehr müssen Zellen des Immunsystems die Fähigkeit besitzen, in einer laminaren Strömung, wie sie z. B. in einem Blutgefäß vorhanden ist, an einem bestimmten Punkt stoppen zu können. Danach können sie aus dem Blutgefäß hinaus und in ein Gewebe hinein wandern.

In der Gruppe von Prof. Dr. med. C. Weber des Instituts für kardiovaskuläre Molekularbiologie der RWTH Aachen wurden Adhäsionsversuche mit Mo-DC unter laminaren Strömungsbedingungen durchgeführt [Kukreti et al., 1997, Weber et al., 1999]. Humane mikrovaskuläre dermale Epithelzellen (HDMEC) wurden in 35 mm Petrischalen angezogen und über Nacht mit IL-1 β (10 ng/ml) vorstimuliert. Die Petrischale diente zugleich als Unterseite einer Durchflusskammer mit parallelen Wänden (s. Abbildung 4.1).

Diese Kammer mit der Petrischale wurde unter ein invertierendes Mikroskop mit einem 20 \times Phasenkontrast-Objektiv der Firma Olympus gelegt. Die zu untersuchenden dendritischen Zellen (10^6 Zellen/ml) wurden in Hanks buffered salt solution resuspendiert, dem kurz vor dem durchzuführenden Experiment jeweils 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl zugesetzt worden war. Die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt. Die Suspension wurde mit einer Rate von 1,5 dyn/cm² für 7 min durch die Durchflusskammer geleitet. Auf verschiedenen Feldern von 0,25 mm² Größe wurde die Anzahl der adhärenen und langsam

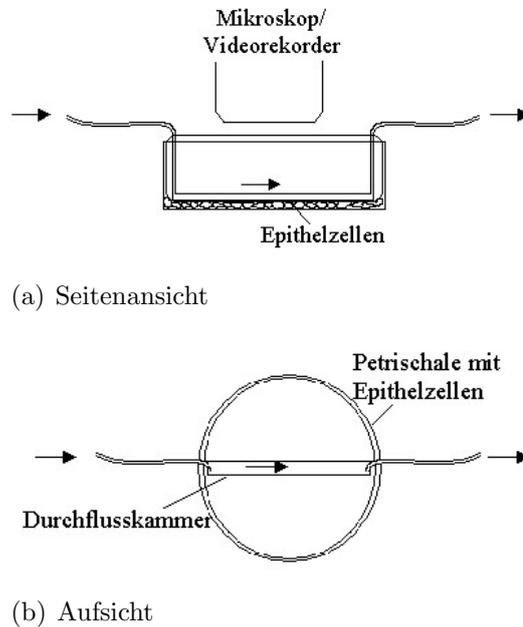


Abbildung 4.1: Aufbau der Durchflusskammer mit Endothelzellen.

In (a) ist eine Seitenansicht dargestellt. In (b) ist eine Ansicht von oben wiedergegeben. Die Pfeile geben die Richtung der Strömung der Zellsuspension wieder.

rollenden Zellen in den letzten 5 min anhand von Videoaufnahmen bestimmt, die während des Experiments mit einer JVC 3CCD Video-Kamera und einem JVC SR L 900 Videorekorder aufgenommen wurden. Je Experiment wurden mindestens 8 solcher Felder ausgewertet.

Aufnahme eines FITC gekoppelten Allergens

Alle Monozyten und DC sind in der Lage, Antigene aufzunehmen. Die DC präsentieren die Antigene mit Hilfe der Rezeptoren des MHC den T-Zellen. DC können allerdings nicht nur potentielle Krankheitserreger aufnehmen sondern auch nicht krankheitserregende Stoffe und diese präsentieren. Kann die humorale Immunreaktion durch IgE-Antikörper und daran assoziierte T-Zellen charakterisiert werden, die Zytokine der T_H2 -Antwort sezernieren, und wird dadurch eine Überempfindlichkeitsreaktion oder Allergie ausgelöst, spricht man bei diesen Antigenen von Allergenen [Robert and Kupper, 1999]. Zu dieser Gruppe gehören z. B. Pollen, Bestandteile des Hausstaubs oder Bestandteile von Tierhaaren. In dieser Arbeit wurde das Hauptallergen der Birke *Bet v 1* in einer

rekombinanten Form verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die Mo-LC und Mo-IDEC von Patienten mit AE besser in der Lage sind, dieses Allergen zu erkennen und aufzunehmen als Mo-LC und Mo-IDEC der Patienten mit Pso oder der Kontrollgruppe.

Vom *Bet v 1* gibt es zwei rekombinante Teilstücke (aa 1-74 und aa 75-106). Mit Hilfe dieser Teilstücke kann untersucht werden, ob es im Allergen ein bestimmtes Epitop gibt, das besonders gut von T-Zellen erkannt wird. In der Gruppe von Prof. R. Valenta in Wien wurden dafür die c-DNA des kompletten Allergens sowie seiner Teilstücke in einen pET-17b Vektor eingefügt und in *Escherichia coli* BL21 exprimiert [Vrtala et al., 1997]. Desweiteren wurde in der selben Gruppe ein Trimer des *Bet v 1* hergestellt, um zu untersuchen, ob es eine immunisierende Wirkung hat. Zur Herstellung des Trimers wurden drei *Bet v 1* codierende Segmente der c-DNA ligiert und in einem pET-17b Vektor in *E. coli* BL21 exprimiert [Vrtala et al., 2001]. Das exprimierte *Bet v 1* sowie seine Teilstücke und das Trimer wurden in dieser Gruppe aus den Sedimenten gelöst und über eine DEAE Sepharose Säule und eine SP Sepharose Säule mit dazwischen liegenden Dialyseschritten aufgereinigt [Vrtala et al., 2001].

Sowohl von den Teilstücken des *Bet v 1* als auch vom Trimer wurde beschrieben, dass sie eine schwächere Aktivierung der T-Zellen herbeiführen.

Zur Detektion wurden sowohl das komplette *Bet v 1* als auch die beiden Teilstücke und das Trimer mit dem Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt. Dadurch kann die Aufnahme des Allergens direkt im Durchflusszytometer als Abnahme der detektierten Intensität von FITC beobachtet werden.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen gezählt und mit frischem RPMI-1640 (very low endotoxine) gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Alle folgenden Schritte fanden bei 37°C statt. Den Zellen wurde $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ spezifisches IgE für *Bet v 1* zugegeben. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend mit $5\ \text{ml}$ frischem Medium gewaschen (Zentrifugation: $315 \times g$, $5\ \text{min}$). Zur Kreuzvernetzung des IgE wurde den Zellen $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ des FITC gekoppelten *Bet v 1*, beziehungsweise der FITC gekoppelten Teilstücke oder des Trimers zugegeben. Es wurde wiederum eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend nochmals

mit 5 ml frischem Medium gewaschen.

Für die Kinetik wurde nach 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 4,5 h, 6 h und 22 h 40 µl der Zellsuspension entnommen. Zur Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Mo-DC und Mo-DC, die nur mit dem spezifischen IgE inkubiert wurden, verwendet. Die Proben wurden mit FACS-Puffer gewaschen. Nach der Resuspension der Zellen in 100 µl FACS-Puffer wurden 2,5 µg/ml CD1a (PE-konjugiert) zugegeben und inkubiert (s. S. 47, Schritte 5 und 6). Danach wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert und ausgewertet.

4.2.6 Proteinbiochemische Methoden

Detektion von Proteinen mittels Durchflusszytometrie

Durch verschiedene Färbungen können Proteine auf der Oberfläche und im Inneren von Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers werden die Fluoreszenz-Intensitäten gemessen. Dabei erhält man Aussagen über die Anzahl fluoreszierender Zellen und die Stärke der Fluoreszenz auf den einzelnen Zellen. So können Rückschlüsse gezogen werden, wie stark ein Protein in oder auf intakten Zellen exprimiert wird, ohne dass diese Populationen vorher in aufwendigen Anreicherungsschritten isoliert werden müssen.

Zur Phänotypisierung der Monozyten, Mo-IDEC und Mo-LC wurde eine Immunofluoreszenz-Färbung mit anschließender Messung in einem Durchflusszytometer der Firma BD (FACSCalibur) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm CellQuest generiert und mit den Programmen CellQuest und WinMDI (Version 2.8) ausgewertet. Das Protokoll zur Oberflächen-Färbung mit unkonjugierten primären Antikörpern ist im Folgenden wiedergegeben, alle Schritte wurden in einer 96-Loch-Platte und bei 4°C durchgeführt:

1. 25.000 - 100.000 Zellen werden je Loch vorgelegt und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: $320 \times g$, 2 min, 4°C)
2. Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Sediments in 100 µl FACS-Puffer, Zugabe von 2,5 µg/ml unmarkierten Antikörpers je Loch, 30 min Inkubation im Dunkeln, Waschen mit FACS-Puffer ($320 \times g$, 2 min, 4°C)

3. Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Sediments in 100 µl FACS-Puffer, Zugabe von 2,5 µg/ml FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG F(ab)₂-Fragment je Loch, 30 min Inkubation im Dunkeln, Waschen mit FACS-Puffer (320 ×g, 2 min, 4°C)
4. Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Sediments in 100 µl FACS-Puffer, Zugabe von 5 µl Mausserum je Loch, 30 min Inkubation im Dunkeln, Waschen mit FACS-Puffer (320 ×g, 2 min, 4°C)
5. Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Sediments in 100 µl FACS-Puffer, Zugabe von 2,5 µg/ml PE-konjugierte Antikörpers je Loch, 10 min Inkubation im Dunkeln, Waschen mit FACS-Puffer (320 ×g, 2 min, 4°C)
6. Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Sediments in 25 µl FACS-Puffer

Alle Färbungen zur Phänotypisierung wurden unter Verwendung einer Kontrollfärbung mit einem unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps durchgeführt. Zur besseren Handhabung der Antikörper wurden sie mit der PBS-azid Lösung verdünnt. Das darin enthaltene Natriumazid diente gleichzeitig als Konservierungsmittel. Als PE-konjugierte Antikörper wurden CD14 für Monozyten und CD1a für Mo-IDEc und Mo-LC verwendet. Zusätzlich wurden die Mo-DC auch mit 7AAD angefärbt. 7AAD bindet an DNA-Fragmente und kann so die bereits toten Zellen einer Population markieren. Dazu wurde der Verdünnung des PE-konjugierten Maus-anti-CD1a Antikörpers zusätzlich 7AAD in einer End-Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt.

Nach der Messung wurde zuerst in einem physikalischen Punktdiagramm („Dot Plot“) die gewünschte Population von Hand eingegrenzt. In einem solchen Dot Plot werden die Streuung des Lichtes in gerader Richtung (forward scatter; FSC) auf der x-Achse und die seitlichen Streuung des Lichtes (sideward scatter; SSC) auf der y-Achse dargestellt (s. Abbildung 4.2(a) und 4.2(b) jeweils linke Seite). Je stärker die Streuung in gerader Richtung ist, desto größer sind die Zellen. Je stärker die seitliche Streuung ist, umso mehr Granula enthalten sie. Im Folgenden wurde nur noch diese eingegrenzte Population betrachtet. Nun wurde die Intensität des dritten Kanals (in dem die Fluoreszenz von

7AAD gemessen wurde) über der Intensität des zweiten Kanals (zum Messen des PE-konjugierten Antikörpers) in einem zweiten Dot Plot dargestellt (s. Abbildung 4.2(a) und 4.2(b) rechte Seiten). Anhand dieser Darstellung konnte die Population der lebenden Zellen eingegrenzt werden. Schließlich wurde im Histogramm die relative Zellzahl über der Intensität des ersten Kanals (zum Messen des FITC-gekoppelten Antikörpers) aufgetragen, wobei nur noch die Schnittmenge der beiden von Hand definierten Populationen betrachtet wurde. Den Histogrammen der Messungen wurden zwei Werte entnommen, zum Einen die Prozentzahl positiver Zellen. Wird von dieser Zahl der prozentuale Anteil der positiven Zellen von der Kontrollfärbung mit dem unspezifischen Antikörper des selben Isotyps abgezogen, so kann man einen quantitativen Nachweis für die schwach exprimierten Oberflächenmarker führen. Wird das zu untersuchende Protein jedoch von fast allen untersuchten Zellen exprimiert, so kann noch als zweiter Wert die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) untersucht werden. Mit Hilfe dieser gemessenen Intensität und der folgenden Gleichung 4.3 kann ein relativer Fluoreszenzindex (RFI) berechnet werden, der einen direkten Vergleich verschiedener Messungen ermöglicht.

$$\text{RFI} = \frac{\text{MFI}_{\text{spezifische Färbung}} - \text{MFI}_{\text{Kontrollfärbung}}}{\text{MFI}_{\text{Kontrollfärbung}}} \quad (4.3)$$

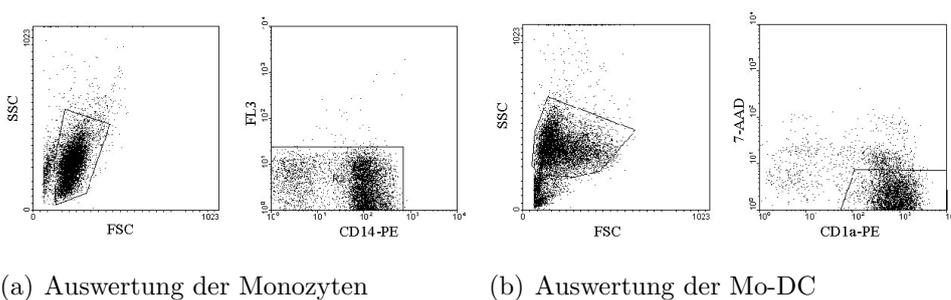


Abbildung 4.2: Auswertung der eingemessenen Monozyten (a) und Mo-IDEC bzw. Mo-LC (b).

Auf der linken Seite sind jeweils das physikalische Punktdiagramm (Dot Plot) zu sehen und rechts die Auftragung des dritten Kanals, welcher bei DCs 7AAD anzeigt, über dem zweiten Kanal, der bei Monozyten CD14 (PE-konjugiert) anzeigt und bei DCs CD1a (PE-konjugiert). In beiden Dot Plots ist das verwendete Gate eingetragen.

Lyse der Zellen

Zum Aufschluss von Zellen gibt es verschiedene Methoden. Zum Einen kann bei sehr großen Probemengen der Aufschluss mechanisch mittels einer Presse erfolgen. Bei kleineren Probemengen ist es jedoch ratsam, den Aufschluss mit Hilfe von Detergenzien vorzunehmen. Da der Verlust bei dieser Methode geringer ist, wurde sie in dieser Arbeit verwendet.

Die Zellen wurden bei $315 \times g$, 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde zwei Mal mit PBS gewaschen, in ein kleineres Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 15 μ l Lyse-Puffer bei 4°C resuspendiert. Dem Lyse-Puffer wurde vor der Verwendung 1 mM PMSF, 5 mM (10 μ g/ml) Leupeptin und 5 mM (10 μ g/ml) Aprotinin zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurde die Suspension erneut zentrifugiert ($20.000 \times g$, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Sediment verworfen wurde. Die Totallysate wurden nach der Proteinbestimmung für Untersuchungen mit der Gelelektrophorese (s. S. 51) verwendet.

| | |
|-------------|-------------------------|
| Lysepuffer: | 10 mM Hepes (pH 7,5) |
| | 10 mM KCL |
| | 10 mM MgCl ₂ |
| | 150 mM NaCl |
| | 1 % (v/v) Igepal CA630 |

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Totallysate wurde nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976] bestimmt. Die Messung basiert auf der Extinktion (E_{595}) des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau bei der Wellenlänge $\lambda = 595$ nm. Der Farbstoff bindet an basische und aromatische Aminosäurereste (einzige Ausnahme Arginin). Dadurch kommt es zu der Änderung des Extinktionswertes. In einer Plastikkuvette wurde folgender Ansatz vorbereitet:

(800 - x) μ l dest. Wasser
x μ l proteinhaltige Probe
200 μ l BioRad Protein Assay-Lösung.

Dieser Ansatz wurde 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer Du640 der Firma Beckmann gemessen. Als Referenz diente der Ansatz ohne proteinhaltiger Probe. Jeder Ansatz wurde dreimal hergestellt und eingemessen. Für die Kalibrierung wurden Lösungen mit 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 5 μ g und 10 μ g BSA verwendet. Aus der Kalibrierung ergab sich folgende Gleichung, zum Berechnen der Proteinmenge im Ansatz.

$$\text{Protein} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = \frac{E_{595} - 7,85 \times 10^3}{47,79} \quad (4.4)$$

SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit der diskontinuierlichen eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Dies kann denaturierend unter Verwendung von SDS ausgeführt werden, oder nicht denaturierend nach der Methode von K. Forchhammer [Laemmli, 1970, Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1994b].

Polyacrylamid ist chemisch inert, so dass es zu keinen chemischen Reaktionen mit den Proteinen kommt. Außerdem wird die Größe der Poren des Gels durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid beeinflusst. Dadurch gibt es für diese Methode einen sehr breiten Anwendungsbereich, der von der Auftrennung sehr kleiner Proteine bis zu sehr großen Proteinen reicht.

Durch die Zugabe von SDS zum Proteingemisch werden alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in den nativen Proteinen aufgehoben und Polypeptide in die einzelnen Untereinheiten zerlegt. Es wird ein SDS-Protein-Komplex gebildet, wobei statistisch betrachtet ein SDS-Molekül auf zwei Aminosäurereste kommt. Jedes SDS-Molekül besitzt im dissoziierten Zustand eine negative Ladung. Durch diese Ladungen ist der gesamte Komplex aus SDS und Protein stark negativ aufgeladen, so dass die Nettoladungen der Proteine bei neutralem pH-Wert keine Rolle mehr spielen. Entsprechend hat das Verhältnis von Ladung zu Molekulargewicht für alle Proteine einen sehr ähnlichen Wert und

die Auftrennung ist ein Resultat des molekularen Sieb-Effektes der Gelporen. Zur Gelelektrophorese wurde eine Apparatur für Minigel (Miniprotean II) der Firma BioRad verwendet. Es wurden das 10 %-ige Trenngel und das 5 %-ige Sammelgel nach T. Maniatis benutzt [Sambrook et al., 1989]. Die hinten stehenden Angaben beziehen sich auf den Ansatz für ein Gel.

Etwa 4,5 ml Trenngel wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 200-300 µl Iso-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Iso-Propanol wieder vollständig entfernt und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet, um die Proben vor der eigentlichen Auftrennung zu fokussieren.

| Trenngel 10 % | Volumen in ml |
|---------------------------------------|---------------|
| Wasser (bidest) | 1,9 |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | 1,700 |
| 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) | 1,300 |
| 10 % (w/v) SDS | 0,050 |
| 10 % (w/v) APS | 0,050 |
| TEMED | 0,002 |

| Sammelgel 5 % | Volumen in ml |
|---------------------------------------|---------------|
| Wasser (bidest) | 1,400 |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | 0,330 |
| 1,0 M Tris/HCl (pH 6,8) | 0,250 |
| 10 % (w/v) SDS | 0,020 |
| 10 % (w/v) APS | 0,020 |
| TEMED | 0,002 |

Die zu untersuchenden Totallysate wurden mit 3-fach Probenpuffer versetzt und vor der Gelelektrophorese 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20.000 ×g, 15 min, 4 °C) und das Gel beladen. Als Protein-Längenstandard wurde der High-Range Rainbow Molecular Weight Marker der Firma Amersham verwendet. Die Elektrophorese erfolgte vertikal

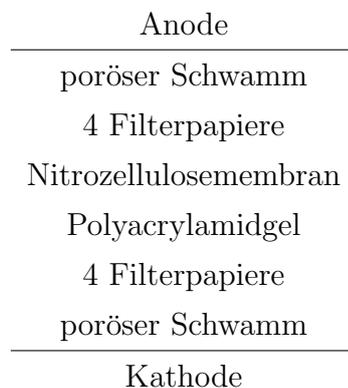
mit 15 V/cm für etwa zwei Stunden. Als Puffer wurde ein 1-fach Laufpuffer nach Maniatis verwendet [Sambrook et al., 1989]. Die verwendeten Puffer-Lösungen sind wie folgt zusammen gesetzt.

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| Proben-Puffer 3-fach: | 120 mM Tris/HCl (pH 6,8) |
| | 4 % (w/v) SDS |
| | 0,05 % (w/v) Bromphenolblau |
| | 20 % (v/v) Glycerin |
| | 10 % (v/v) β -Me |

| | |
|--------------------|-----------------|
| Laufpuffer 5-fach: | 125 mM Tris |
| | 1,25 M Glycin |
| | 0,5 % (w/v) SDS |

Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Nach der Trennung der Proteine mittels PAGE wurden sie auf eine nicht aktivierte Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte durch so genanntes „Elektroblotting“ im Tank-Verfahren in einer vertikalen Transfer-Apparatur der Firma BioRad. Die hierfür verwendeten Schwämme und Filter (3MM, Whatman) sowie die Nitrozellulose wurden mit Transfer-Puffer gesättigt. Anschließend wurden alle Materialien entsprechend dem folgenden Schema zwischen den Elektroden angeordnet, dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine Luftbläschen eingeschlossen wurden.



Der Transfer wurde mit 7 V/cm für drei Stunden, bzw. mit 1,5 V/cm über Nacht in Transfer-Puffer durchgeführt. Um die entstehende Wärme im Tank abzuführen, wurde der Puffer durch einen Magnetrührer bewegt und die Apparatur in einen Raum mit 4 °C Lufttemperatur gestellt. Der Transfer-Puffer setzte sich wie folgt zusammen.

Transfer-Puffer 1-fach: 190 mM Glycin
 250 mM Tris
 0,002 % (w/v) SDS
 20 % (v/v) Methanol

Detektion der immobilisierten Proteine

Die immobilisierten Proteine, die nach dem „Elektroblotting“ auf der Nitrozellulosemembran vorhanden sind, können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dabei werden unkonjugierte Antikörper verwendet, die das gesuchte Protein erkennen (primäre Antikörper). An diese Antikörper binden sekundäre Antikörper, die mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt sind. Die HRP spaltet H_2O_2 . Dabei entstehen Sauerstoffradikale, die für die Oxidation weiterer Substrate verwendet werden können. Das verwendete ECL Detektionssystem der Firma Amersham nutzt diese Reaktion der HRP, um Luminol unter alkalischen Bedingungen und der Anwesenheit von H_2O_2 zu oxidieren. Dabei wird das Luminol kurzfristig in einen angeregten Zustand versetzt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird die Energiedifferenz in Form von Lichtquanten der Wellenlänge $\lambda_{max} = 428 \text{ nm}$ abgegeben (Chemilumineszenz). Diese Lichtquanten können detektiert werden.

Im Folgenden wird mit einer Tris-gepufferten Kochsalzlösung (TBS, 1-fach) gearbeitet. Zusätzlich kann die TBS-Lösung Tween 20 enthalten (TBST, 1-fach). Die Zusammensetzung dieser beiden Lösungen ist auf Seite 38 beschrieben. Nach dem Transfer wurde die Membran zum Blockieren von freier Oberfläche für mindestens eine Stunde in TBS mit 2 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend wurde einmal mit TBST gewaschen und die Membran für 3 bis 3,5 h mit dem primären Antikörper, der mit TBST verdünnt wurde, inkubiert. Durch drei folgende Waschstschritte mit TBST für jeweils 5 min wurde

ungebundener Antikörper entfernt. Die Membran wurde danach für 1 bis 1,5 h mit dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper, ebenfalls laut den Herstellerangaben mit TBST verdünnt, inkubiert. Nach weiteren fünf Waschstufen mit TBST für jeweils 10 min wurde die Membran für eine Minute mit den ECL-Reagenzien der Firma Amersham laut deren Angaben inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Detektor (Intelligent Dark Box II) der Firma Fuji. Die Expositionsdauer betrug 5 min für die Detektion von Actin und 30 min für die Detektion von Cytohesin-1. Zur Auswertung und Quantifizierung wurde die Software „Advanced Image Data Analyzer“ (AIDA) verwendet. Anschließend wurde zusätzlich eine Filmplatte (Hyperfilm; Amersham) über Nacht aufgelegt und entwickelt (Entwicklermaschine X-omat 5000 RA; Kodak).

Zur Auswertung wurden die erhaltenen Werte für die geschwärzten Flächen des Films zum Nachweis von Cytohesin-1 durch die dazugehörigen Werte der Actin-Detektion dividiert. Die so berechneten Werte werden als relative Flächeneinheiten bezeichnet und erlauben einen direkten Vergleich mehrerer Blots miteinander.

Entfernen von Antikörpern auf der Nitrozellulosemembran

Beim „Stripping“-Verfahren können spezifisch gebundene Antikörper von einer Nitrozellulosemembran entfernt werden. Dadurch besteht die Möglichkeit einer mehrfachen Detektion mit Antikörpern verschiedener Spezifitäten.

Zum Entfernen eines spezifischen Antikörpers wurde die Nitrozellulosemembran 30 min bei 65 °C im „Stripping“-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran fünfmal 5 min in TBS geschwenkt.

„Stripping“-Puffer 1-fach: 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)
 2 % (w/v) SDS
 100 mM β -Mercaptoethanol

4.2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten der Expression von Oberflächenmolekülen und des Cytohesin-1 wurde das Programm SPSS (Version 12.0.1) ver-

wendet. Es wurden nichtparametrische Tests mit zwei unabhängigen Variablen durchgeführt (Mann-Whitney-Test). Mit Hilfe dieser Tests konnten die Fehlerwahrscheinlichkeiten p bestimmt werden.

Für die Statistiken zweier voneinander abhängiger Variablen wurden die Stichproben erst auf eine Normalverteilung untersucht. Waren die Stichproben normalverteilt, wurde ein T-Test für zwei abhängige Stichproben durchgeführt. Waren die Stichproben nicht normalverteilt, wurde ein nichtparametrischer Test (Wilcoxon-Test) für zwei voneinander abhängige Stichproben verwendet. Ab einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p \leq 0,050$ wurde von einem signifikanten Unterschied, ab $p \leq 0,001$ wurde von einem hoch signifikanten Unterschied zwischen den Werten ausgegangen [Stoyan, 1993].

5 Ergebnisse

5.1 Phänotypisierung der Monozyten, LC und IDEC

Aus peripherem Blut von Patienten mit atopischem Ekzem (AE) oder Psoriasis vulgaris (Pso) und aus dem Blut eines Kollektives gesunder Spender wurden Monozyten isoliert. Die isolierten Monozyten wurden mit CD14 als klassischem Marker für diese Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit untersucht. Sie hatten einen Reinheitsgrad von 75-90%. Desweiteren wurden die frisch isolierten Monozyten auf die Oberflächen-Expression verschiedener α - und β -Ketten der Integrine, Selektine, Tetraspanine, Fc-Rezeptoren, Rezeptoren der MHC-Klasse I und Klasse II sowie einiger kostimulatorischer Moleküle mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dadurch können Aussagen über die Anzahl der positiven Zellen (in Prozentangaben der eingelesenen CD14-positiven Zellen) und über Werte des relativen Fluoreszenzindex (RFI) der positiven Zellen erhalten werden. Die RFI-Werte spiegeln die durchschnittliche Anzahl der untersuchten Moleküle je Zelle wieder. Aus diesen Angaben kann auf die Fähigkeit zur Adhäsion und Migration sowie zur Allergenaufnahme und -präsentation der Monozyten geschlossen werden. Außerdem wurde die Expression von Cytohesin-1 in diesen Zellen untersucht.

Aus den Monozyten wurden nach den Beschreibungen von K. Reich und N. Novak Langerhans Zellen (LC)-ähnliche und inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDEC)-ähnliche DC kultiviert [Reich et al., 2001, Novak et al., 2002b, Novak et al., 2004]. Diese wurden wie die Monozyten sowohl auf die Expression einiger Oberflächenmarker untersucht als auch auf die zytoplasmatische Expression von Cytohesin-1.

Es wird davon ausgegangen, dass die Expression des hochaffinen Rezeptors für IgE, Fc ϵ RI, auf den LC und IDEC bei Patienten mit AE wesentlich an der Aufnahme eines Allergen beteiligt ist. Bei Patienten, die eine extrinsische Form des AE aufweisen, werden erhöhte IgE-Werte im Serum nachgewiesen.

Durch Bindung des spezifischen IgE an ein Allergen und die weitere Bindung des IgE-Allergen-Komplexes an den $Fc\epsilon RI$ sind die Zellen besser in der Lage, das Allergen aufzunehmen, zu prozessieren und schließlich einer T-Zelle zu präsentieren [Novak et al., 2004].

In vivo können DC Allergene aufnehmen. Wenn an das Allergen spezifisches IgE gebunden ist, kann eine Allergenaufnahme über Rezeptoren für IgE initiiert werden. Dabei können die Rezeptoren des IgE *in vivo* durch die Bindung des IgE-gebundenen Allergens vernetzt werden. Um den Einfluss einer Kreuzvernetzung der Fc-Rezeptoren für IgE ($Fc\epsilon RI$ und $Fc\epsilon RII/ CD23$) auf die Expression von Selektinen, Integrinen und Tetraspaninen vor allem bei den Mo-LC und Mo-IDEC der Patienten mit AE zu untersuchen, wurde einem Teil der kultivierten Mo-LC und Mo-IDEC (zusammengefasst als Mo-DC) an Tag sieben oder acht Myeloma-IgE hinzugegeben. Um das Signal zu verstärken, das durch die Bindung von IgE an seine Rezeptoren generiert wird, wurde den Zellen nach einer Stunde Inkubation mit Myeloma-IgE anti-IgE-Antikörper zur Kreuzvernetzung des gebundenen IgEs hinzugegeben. Die so behandelten Zellen werden im Folgenden stimulierte Zellen genannt. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung des IgE an seine Rezeptoren bei gesunden Spendern keinen deutlichen Einfluß auf die Expression der Selektine, Integrine und Tetraspanine hat.

Nach sieben oder acht Tagen der Kultivierung der Monozyten zu Mo-DC waren 50-60% der eingesetzten Monozyten zu Mo-IDEC und Mo-LC differenziert. Diese Zellen wurden mit CD1a (als Marker für dendritische Zellen) und 7AAD (als Marker für tote Zellen) gefärbt und die Oberflächen-Expression von Selektinen, Tetraspaninen sowie α - und β -Ketten der Integrine mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die CD1a-positiven lebenden Zellen wiesen einen Reinheitsgrad von 70-80% auf.

Bei den folgenden Abbildungen sind immer dann Fehlerwahrscheinlichkeiten angegeben, wenn diese das Kriterium $p \leq 0,050$ erfüllen. Wurde das Kriterium nicht erfüllt, so wurden die Unterschiede als nicht signifikant betrachtet. Nach unserer Auffassung war ein Rezeptor nicht exprimiert, wenn der prozentuale Anteil positiver Zellen eines Markers geringer als 7% und der RFI-Wert geringer als 1,5 war.

5.1.1 Expression der Selektine

Wie eingangs bereits beschrieben, kann durch die wiederholte Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden auf den Endothelzellen die Geschwindigkeit der Selektin-exprimierenden Zellen im Blutstrom reduziert werden (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Im Anhang auf S. XV befindet sich eine herausklappbare Tabelle, in der die signifikanten Unterschiede zusammenfassend dargestellt sind. Da CD62E (E-Selektin) sowohl auf den Monozyten als auch auf den Mo-LC und Mo-IDEC nicht exprimiert wurde, wird auf die Expression von CD62E in dieser Arbeit nicht eingegangen.

In Abbildung 5.1 sind Histogramme der Oberflächenexpression von CD62L und CD62P auf Monozyten wiedergegeben, in denen neben der Isotypen-Kontrolle je eine repräsentative Messung der drei Kollektive dargestellt ist. Die relative Zellzahl wurde über der Fluoreszenz-Intensität des Antikörpers aufgetragen, wie es auf S. 47 ff. im Kapitel zu den Methoden beschrieben wurde.

Diese Abbildung zeigt, dass die Populationen der CD62L-positiven und CD62P-positiven Monozyten homogen waren. Der prozentuale Anteil CD62L-positiver Monozyten betrug im Mittel 35 %, der CD62P-positiver Monozyten 90 % bei gesunden Spendern. Der prozentuale Anteil CD62L-positiver Monozyten bei Patienten mit AE war mehr als doppelt so hoch verglichen mit gesunden Probanden und auch wesentlich höher als bei Patienten mit Pso (vgl. Abbildung A.1 im Anhang S. I). Auch die Population der CD62L-positiven Monozyten von Patienten mit Pso war fast doppelt so stark im Vergleich zu den Monozyten der gesunden Spender. Für die Expression von CD62P wurden keine Unterschiede zwischen den drei Kollektiven gefunden.

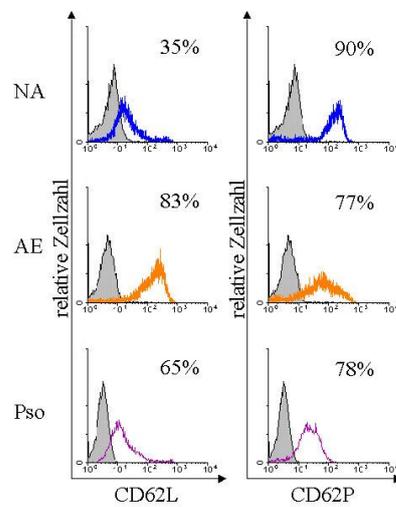


Abbildung 5.1: Expression der Selektine CD62L und CD62P auf Monozyten.

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

In Abbildung 5.2 sind die Werte des RFI für die Expression von CD62L und CD62P auf den Monozyten dargestellt. Die Berechnung der RFI-Werte aus den Rohdaten ist auf S. 47 ff. im Kapitel zu den Methoden beschrieben. CD62P (RFI = 21) wurde etwa dreimal so stark auf den Monozyten der gesunden Spender exprimiert wie CD62L (RFI = 7). Bei den Monozyten der Patienten mit AE wurde für CD62L ein Wert von 35 erreicht, so dass die Expression etwa fünfmal stärker als bei den Monozyten der gesunden Spender war und das 3,5-fache der Expression auf den Monozyten der Patienten mit Pso. Bei den Monozyten der Patienten mit Pso zeigte sich, dass die Expression von CD62P nur halb so stark war wie auf den Monozyten der gesunden Spender und sogar nur ein Drittel der Expressionstärke von den Monozyten der Patienten mit AE erreicht wurde.

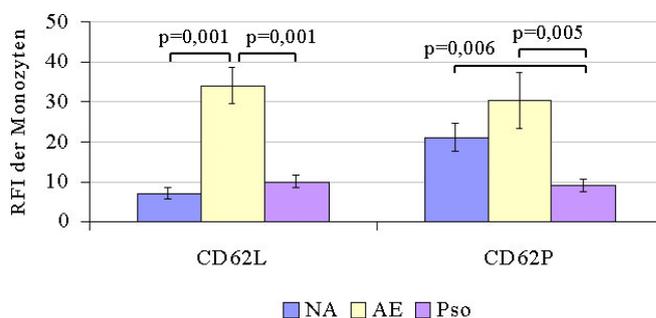


Abbildung 5.2: Expression der Selektine CD62L und CD62P aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 9$

CD62L war weder auf den Mo-LC noch auf den Mo-IDEC exprimiert.

Die Histogramme in Abbildung 5.3 zeigen die Expression von CD62P auf Mo-LC und Mo-IDEC. Auch hier waren die Populationen der CD62P-positiven Zellen bei den drei Kollektiven homogen. Auffallend war die starke Abnahme der CD62P-positiven Zellen von den Monozyten zu den Mo-LC und Mo-IDEC (zusammengefasst als Mo-DC) bei den gesunden Spendern und bei beiden Patientenkollektiven (vgl. Abbildung A.1 ff. im Anhang ab S. I). Waren bei den Monozyten noch 90 % der Monozyten gesunder Spender CD62P-positiv, so waren es bei den Mo-DC nur noch rund 35 %. Bei beiden Patientenkollektiven betrug der prozentuale Anteil CD62P-positiver unstimulierter Mo-LC nur rund 10-15 % und war damit signifikant geringer im Vergleich zu den Zellen der gesunden Probanden. Bei den Mo-LC wurde zudem festgestellt, dass der prozentuale Anteil CD62P-positiver Zellen von den gesunden Spendern durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern um rund 5 % zunahm. Nur 5 % bzw. 8 % der unstimulierten bzw. stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso exprimierten CD62P verglichen mit den Zellen der gesunden Spender (vgl. Abbildung A.3 im Anhang S. II).

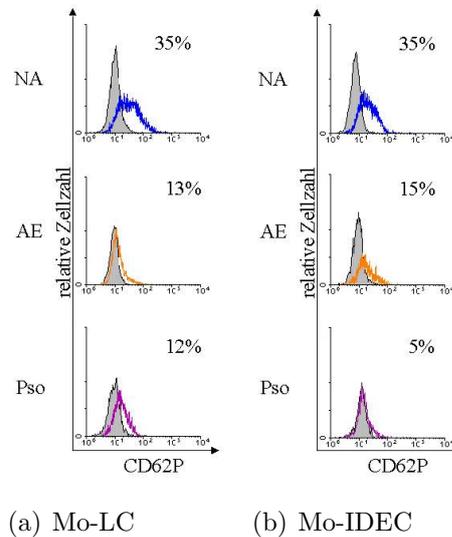


Abbildung 5.3: Expression von CD62P auf unstimulierten Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b). Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Die Werte des RFI waren nach der Reifung der Monozyten zu Mo-LC in der Tendenz stark verringert bei den gesunden Spendern, jedoch auch bei beiden Patientengruppen (vgl. Abbildungen 5.2 und 5.4). Zudem waren die Werte bei den unstimulierten Mo-LC beider Patientengruppen etwa 3,5-fach schwächer als bei den unstimulierten Mo-LC der gesunden Spender. Auch der Wert des RFI der stimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso war um zwei Drittel reduziert gegenüber dem Wert des RFI der stimulierten Zellen der gesunden Spender. Durch die Stimulation der Mo-LC mit IgE und anti-IgE-Antikörpern kam es tendenziell zu einer schwächeren Expression des CD62P bei den Zellen der gesunden Spender. Für die scheinbar stärkere Expression des CD62P nach der IgE-Kreuzvernetzung auf den Mo-LC beider Patientengruppen konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden.

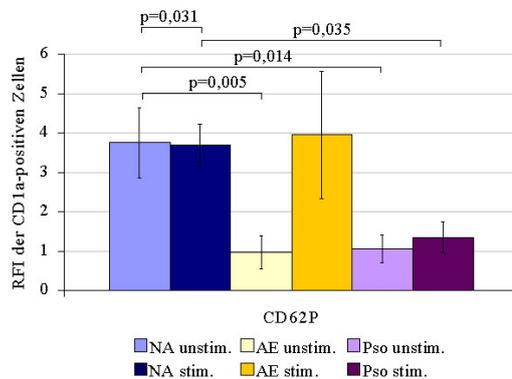


Abbildung 5.4: Expression von CD62P auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 7$, AE: $n = 8$, Pso: $n = 7$

Wie schon für die Mo-LC beschrieben wurde, exprimierten auch die Mo-IDEC CD62P stark vermindert im Vergleich zu den Monozyten (vgl. Abbildung 5.2). Zudem war der RFI-Wert für die unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso bis auf ein Sechstel auf den Wert der unstimulierten Mo-IDEC des gesunden Kollektives gesunken.

Zusammenfassend wurde CD62L auf den Monozyten der Patienten mit AE hoch signifikant stärker exprimiert verglichen mit den Monozyten beider anderen Kollektive. CD62P wurde sowohl auf den unstimulierten und stimulierten Mo-LC als auch auf den unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso schwächer exprimiert im Vergleich zu den Zellen der gesunden Spender.

5.1.2 Expression der Integrine

Außer den Selektinen sind auch die Integrine maßgeblich bei der Zell-Zell-Adhäsion der Monozyten an den Endothelzellen, der folgenden Extravasation der Zellen aus dem Blutstrom in das Gewebe, sowie der Wanderung im Gewebe beteiligt (s. Abschnitt 2.4.2).

Wie bereits dargestellt wurde, werden Integrine als Heterodimere an der Oberfläche der Zellen exprimiert, welche aus einer α - und einer β - Kette bestehen.

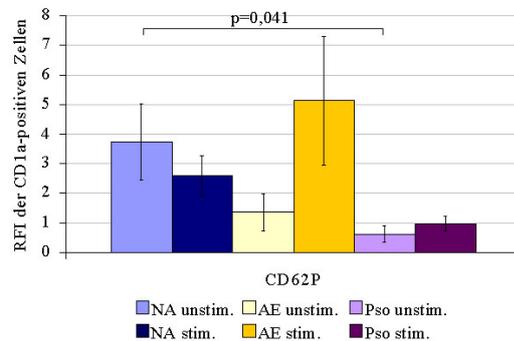


Abbildung 5.5: Expression des CD62P auf Mo-IDECS aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 7$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 7$

Im Folgenden wird die Expression der einzelnen α - und β -Ketten untersucht und nicht die Expression des kompletten Heterodimers, da dies eine spezifischere Charakterisierung der Zellen zu läßt. Im Anhang auf S. XIV befindet sich eine Tabelle in der die bekannten Heterodimer der untersuchten α - und β -Ketten zusammengefasst dargestellt sind.

Expression der α -Ketten der Integrine

Wie im Kapitel zu den Grundlagen bereits beschrieben wurde, werden nicht alle bekannten α - und β -Ketten der Integrine auf Leukozyten exprimiert. Daher wurde hier nur die Expression von α -Ketten der Dimere untersucht, welche auch auf Leukozyten vorkommen. Explizit sind das CD11a (α_L), CD11b (α_M), CD11c (α_X), CD41 (α_{IIb}), CD49a (α_1), CD49b (α_2), CD49c (α_3), CD49d (α_4) und CD49e (α_5). Zur besseren Übersicht wurden die untersuchten α -Ketten in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe I besteht aus CD11a, CD11b, CD11c und CD41, Gruppe II umfasst die restlichen fünf α -Ketten. Im Anhang auf S. XVI ff. befinden sich zwei herausklappbare Tabellen mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden.

Da sich das Expressionsmuster von CD41 auf den Monozyten zwischen den drei Kollektiven nicht unterschied, wird auf die Darstellung von CD41 bei den Monozyten verzichtet.

In Abbildung 5.6 sind Histogramme der α -Ketten CD11a, CD11b und CD11c für Monozyten dargestellt. Die Populationen waren homogen bei den drei Kollektiven. Die vier α -Ketten der ersten Gruppe wurden von 92 % (CD11a und CD41) bzw. 96 % (CD11b und CD11c) der Monozyten gesunder Spender exprimiert. Statistische Auswertungen ergaben, dass CD11a von signifikant mehr Monozyten der Patienten mit AE exprimiert wurde im Vergleich zu beiden anderen Kollektiven (vgl. Abbildung A.4 im Anhang auf S. III). Auch die prozentualen Anteile CD11b- und CD11c-positiver Monozyten von Patienten mit AE (jeweils 97 %) waren signifikant erhöht im Vergleich zu den Monozyten von Patienten mit Pso (jeweils 95 %).

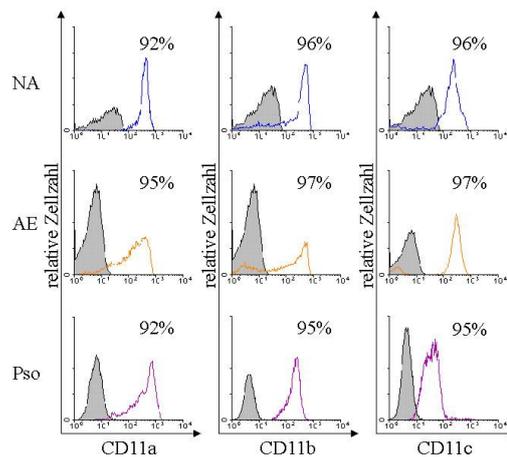


Abbildung 5.6: Expression der α -Ketten CD11a, CD11b und CD11c von Integrinen auf Monozyten.

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der positiven Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Die RFI-Werte für diese Gruppe der α -Ketten sind in Abbildung 5.7 wiedergegeben. CD11b wurde auf den Monozyten der gesunden Spender am stärksten exprimiert (RFI = 104). Die Expression von CD11a und CD11c bei den gesunden Spendern betrug nur noch knapp zwei Fünftel des Wertes von CD11b. Die Expression des nicht gezeigten CD41 auf den Monozyten des gesunden Kollektives war mit einem Wert von 245 mehr als doppelt so stark wie die Expression

von CD11b auf den Monozyten dieses Kollektives. Der RFI-Wert von CD11a für die Monozyten der Patienten mit AE (RFI = 84) war fast doppelt so hoch im Vergleich zum gesunden Kollektiv und etwa viermal stärker verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso (RFI = 24). Bei den Monozyten der Patienten mit Pso war auch die Expression von CD11b 2,5-fach schwächer als bei den gesunden Spendern und sogar 3,5-fach schwächer verglichen mit den Monozyten der Patienten mit AE. Auch die Expression von CD11c war auf den Monozyten der Patienten mit Pso nur halb so stark wie auf den Monozyten der Patienten mit AE. Alle diese Unterschiede waren hoch signifikant.

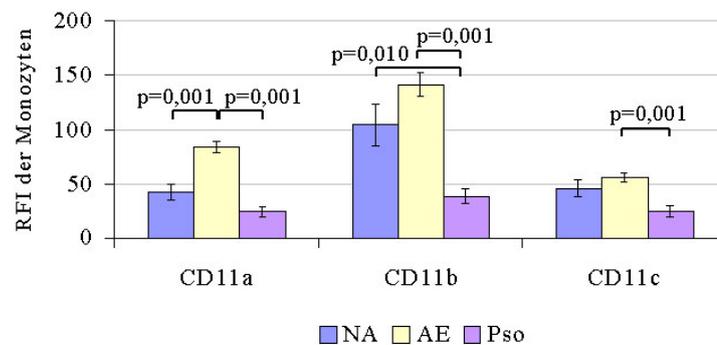


Abbildung 5.7: Expression der α -Ketten von Integrinen aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse (I).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

In den dargestellten Histogramme der Expression von CD11a und CD41 (Abbildung 5.8) waren die Populationen unstimulierter Mo-LC und Mo-IDEC bei den drei Kollektiven homogen. CD11a, CD11b und CD11c wurden von einer ähnlich starken Population der Mo-LC und Mo-IDEC gesunder Spender exprimiert wie bei den Monozyten. Der prozentuale Anteil CD41-positiver Mo-LC und Mo-IDEC war bei den gesunden Spendern etwa um zwei Neuntel geringer verglichen mit den Monozyten des selben Kollektives und betrug nun 70% (Mo-LC) bzw. 62% (Mo-IDEC).

Nach den statistischen Auswertungen der prozentualen Anteile unstimulierter und stimulierter Mo-LC waren die Populationen CD11a-positiver Zellen von Patienten mit AE jeweils ein Zehntel schwächer als bei Patienten mit

Pso (vgl. Abbildung A.5 im Anhang auf S. IV). Zudem nahm die Population CD41-positiver Mo-LC der Patienten mit Pso durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörper von 68 % auf 66 % signifikant ab. Für CD11b war die Expression auf etwa 98 % der Mo-LC für die drei Kollektiven gleich.

Für die unstimulierten Mo-IDEC zeigte die statistische Auswertung, dass die Population CD11b-positiver Zellen der Patienten mit Pso um fünf Einheiten erhöht war im Vergleich zu den unstimulierten Mo-IDEC der gesunden Spender (vgl. Abbildung A.6 im Anhang auf S. V). Auch der prozentuale Anteil CD41-positiver unstimulierter Mo-IDEC der Patienten mit Pso war um ein Viertel höher verglichen mit den Zellen der gesunden Spender. Bei den Spendern mit AE war dieser prozentuale Anteil CD41-positiver unstimulierter Mo-IDEC sogar um ein Drittel höher im Vergleich zum gesunden Kollektiv. Dieser Unterschied war hoch signifikant. Zudem war die Population CD11a-positiver unstimulierter Mo-IDEC der Patienten mit AE (72 %) um zwei Neuntel schwächer verglichen mit den Zellen der Patienten mit Pso (91 %).

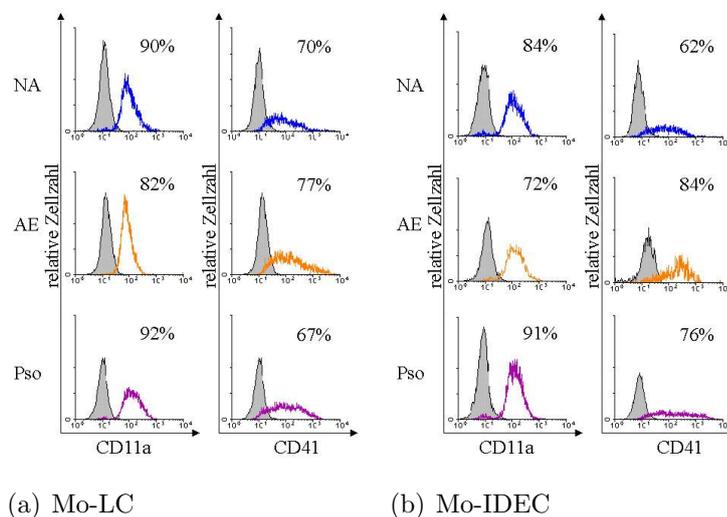


Abbildung 5.8: Expression der α -Ketten CD11a und CD41 von Integrinen auf unstimulierten Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Da für die Expression von CD11b auf diesen Zellen weder zwischen den Kollektiven noch zwischen den stimulierten und unstimulierten Mo-LC Unterschiede auftraten, wird auf diese Darstellung verzichtet.

Bei den gesunden Spendern war der RFI-Wert für CD11a auf den Mo-LC (RFI = 11) auf ein Viertel des Wertes der Monozyten (RFI = 42) des selben Kollektives gesunken (vgl. Abbildung 5.7 und Abbildung 5.9). Der Wert der Expression von CD41 (RFI = 26) auf Mo-LC der gesunden Spender war sogar auf ein Zehntel des Wertes der Monozyten (RFI = 245) gesunken. Dagegen wurde CD11c bei gesunden Spendern auf den Mo-LC fast doppelt so stark exprimiert verglichen mit den Monozyten. Die Expression von CD11b war bei den Mo-LC der gesunden Probanden unverändert zu den Monozyten. Auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE war die Expression von CD11a um den Faktor 1,8 geringer gegenüber dem Wert der Zellen des gesunden Kollektives und um den Faktor 2,0 verglichen mit den Zellen der Patienten mit Pso. Bei den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso war die Expression von CD11c etwa 30% stärker verglichen mit den RFI-Werten der beiden anderen Kollektive. Zudem nahm die Expression von CD11a auf den Mo-LC der Patienten mit Pso durch die Stimulation und Kreuzvernetzung des IgE um den Faktor 1,4 ab, wohingegen die Expression von CD41 durch diese Stimulation auf den Mo-LC der Patienten mit Pso um ein Zehntel zunahm.

Wie auch bei den Mo-LC war die Expression von CD11a (RFI = 11) auf den Mo-IDEC der gesunden Spender auf ein Viertel des Wertes der Monozyten gesunken und die Expression von CD41 (RFI = 126) war ebenfalls auf ein Zehntel des Wertes der Monozyten gesunken (vgl. Abbildungen 5.7 und 5.10). Die Expression von CD11c (RFI = 102) hingegen war mehr als doppelt so stark verglichen mit den Monozyten (RFI = 46). CD11b wurde auf den Mo-IDEC ebenso stark exprimiert wie auf den Monozyten der gesunden Spender. Die Expression von CD11a war um 40% reduziert bei den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE verglichen mit Zellen der Patienten mit Pso. Auch war die Expression von CD11b auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso um den Faktor 1,6 erhöht gegenüber dem Wert der gesunden Spender. Dies entsprach einer 2,5-fach stärkeren Expression verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso. Der RFI-Wert von CD11c auf diesen

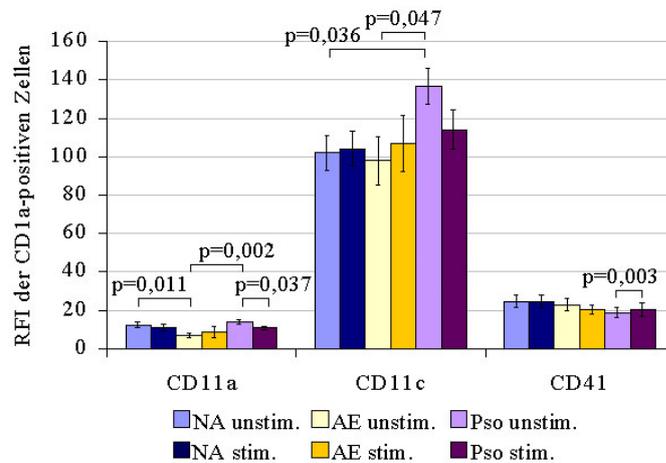


Abbildung 5.9: Expression der α -Ketten CD11a, CD11c und CD41 von Integrinen auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (I). Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

unstimulierten Zellen der Patienten mit Pso war um den Faktor 1,4 erhöht gegenüber dem Wert des gesunden Kollektives. Bei den stimulierten Mo-IDEC war die Expression von CD11b um knapp 40 % geringer bei Patienten mit AE verglichen mit dem RFI-Wert der Zellen von Patienten mit Pso. Zudem nahm die Expression von CD11a auf den Mo-IDEC der Patienten mit AE um ein Zehntel durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern zu, während die Expression von CD11c bei diesem Kollektiv durch die IgE-Kreuzvernetzung um drei Zehntel abnahm.

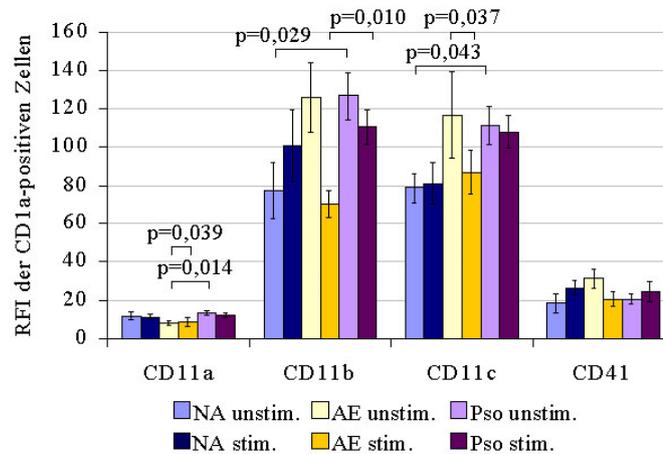


Abbildung 5.10: Expression der α -Ketten CD11a, CD11b, CD11c und CD41 von Integrinen auf Mo-IDEC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (I).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 11$

In Abbildung 5.11 sind Histogramme der Expression von CD49a, CD49d und CD49e auf den Monozyten der drei Kollektive dargestellt. Demnach waren die Populationen der CD49e-positiven Monozyten homogen, während für die Expression von CD49a und CD49d zwei Populationen darstellbar waren, je eine CD49a- und CD49d-positive und -negative. Die kleinere Population waren für den Antikörper negativ. Fast alle Monozyten der gesunden Spender waren für CD49d (89 %) und CD49e positiv (96 %) (vgl. Abbildung A.4 im Anhang auf S. III). CD49b wurde nur auf rund 56 % der Monozyten der gesunden Spender exprimiert (nicht gezeigt) und CD49a auf 27 % der Monozyten sowie CD49c auf 8 % der Monozyten gesunder Spender (ebenfalls nicht gezeigt). Die statistischen Untersuchungen ergaben für die Monozyten der Patienten mit Pso, dass die Population CD49a-positiver Zellen (45 %) fast doppelt so stark war verglichen mit den Monozyten gesunder Spender. Die Population der CD49d-positiven Monozyten der Patienten mit AE war mit 96 % hoch signifikant stärker verglichen mit den anderen beiden Kollektiven und ebenso waren die prozentualen Anteile CD49e-positiver Monozyten der Patienten mit AE mit 98 % höher verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso.

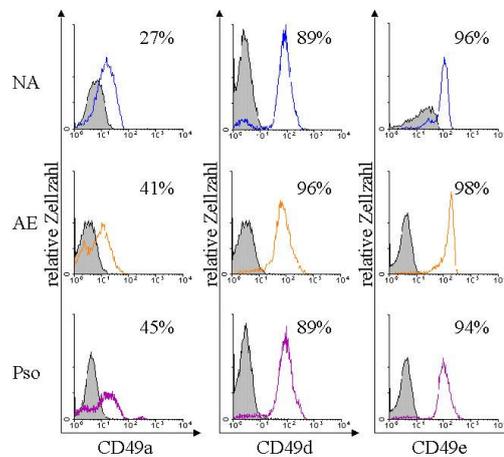


Abbildung 5.11: Expression der α -Ketten CD49a, CD49d und CD49e von Integrinen auf Monozyten.

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

CD49e (RFI = 31) wurde auf den Monozyten des gesunden Kollektives am stärksten exprimiert (vgl. Abbildung 5.12). Der Wert der Expression des CD49d bei gesunden Spendern betrug nur ein Drittel des Wertes der Expression von CD49e. Die Expression von CD49b bei gesunden Probanden war nur etwa ein Sechstel des RFI-Wertes der Expression von CD49e. Der Wert der Expression von CD49a auf den Monozyten des gesunden Kollektives betrug ein Zehntel der Expression von CD49e. Am schwächsten wurde CD49c (RFI = 1) auf den Monozyten der gesunden Spender exprimiert. Der statistische Vergleich der RFI-Werte der beiden Patientengruppen mit dem gesunden Kollektiv zeigte für die Monozyten der Patienten mit AE, dass CD49b (RFI = 7,8) fast doppelt so stark exprimiert wurde verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso (RFI = 4,2). Auch CD49e wurde auf den Monozyten von Patienten mit AE (RFI = 33) fast doppelt so stark exprimiert wie auf den Monozyten der Patienten mit Pso (RFI = 18). Die Expression von CD49d war bei den Patienten mit AE signifikant verdoppelt gegenüber den Monozyten der gesunden Probanden und fast dreimal so hoch verglichen mit dem RFI-Wert

der Monozyten der Patienten mit Pso. Auf den Monozyten der Patienten mit Pso war ausschließlich die Expression von CD49c um das 8-fache gesteigert gegenüber den Monozyten der Patienten mit AE.

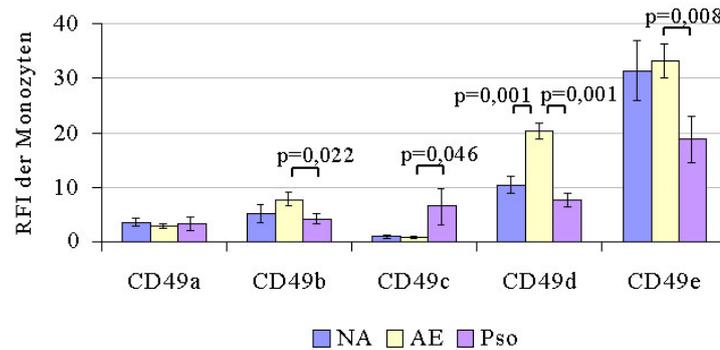


Abbildung 5.12: Expression der α -Ketten CD49a, CD49b, CD49c, CD49d und CD49e von Integrinen aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

CD49a wurde weder auf den Mo-LC noch auf den Mo-IDEC exprimiert.

Die Expressionen von CD49b und CD49d auf unstimulierten Mo-LC sowie CD49d auf unstimulierten Mo-IDEC sind als Histogramme in Abbildung 5.13 dargestellt. Für diese Rezeptoren waren die Populationen der CD1a-positiven Zellen homogen verteilt. Bei den Mo-LC und Mo-IDEC waren die prozentualen Anteile CD49e-positiver und für die Mo-LC auch CD49c-positiver Zellen annähernd gleich geblieben verglichen mit den Monozyten (vgl. Abbildungen A.4 ff. im Anhang ab S. III). Der prozentuale Anteil CD49d-positiver Mo-DC (Mo-LC und Mo-IDEC, jeweils etwa 30%) war tendenziell auf ein Drittel des Wertes der Monozyten gesunken. Der prozentuale Anteil CD49b-positiver Mo-LC gesunder Spender war um etwa ein Fünftel reduziert gegenüber den Monozyten.

Die statistische Auswertung dieser prozentualen Anteile zeigte, dass der Wert der CD49c-positiven stimulierten Mo-LC der Patienten mit AE viermal höher war verglichen mit den stimulierten Mo-LC des gesunden Kollektives (vgl. Abbildung A.5 im Anhang auf S. IV). Die prozentualen Anteile CD49d-positiver unstimulierter Mo-LC waren bei Patienten mit AE (61%) und Patienten mit

Pso (57%) fast doppelt so hoch im Vergleich zu den Zellen der gesunden Probanden (33%).

Für die Mo-IDEC ergab sich, dass CD49b und CD49c wie CD49a ebenfalls nicht mehr auf diesen Zellen exprimiert wurden. Der prozentuale Anteil CD49d-positiver unstimulierter Mo-IDEC der Patienten mit Pso (62%) war doppelt so hoch verglichen mit den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE (30%) und der gesunden Spender (27%) (vgl. Abbildung A.6 im Anhang auf S. V). Diese Unterschiede waren hoch signifikant.

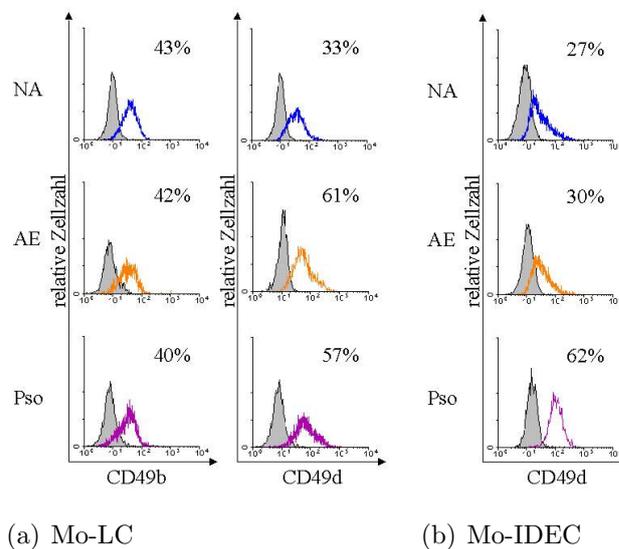


Abbildung 5.13: Expression der α -Ketten CD49b und CD49d von Integrinen auf unstimulierten Mo-LC (a) und der α -Kette CD49d auf unstimulierten Mo-IDEC (b).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Die dargestellten RFI-Werte der unstimulierten und stimulierten Mo-LC in Abbildung 5.14 waren für CD49c und CD49e bei den gesunden Spendern nahezu unverändert zu den Werten der Monozyten (vgl. Abbildung 5.12). Dagegen waren die RFI-Werte des gesunden Kollektives für CD49b um zwei Fünftel und für CD49d um etwa sieben Zehntel reduziert gegenüber den Monozyten. Die Expression von CD49b auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit

AE (RFI = 1,8) war um etwa ein Drittel reduziert verglichen mit den unstimulierten Mo-LC der gesunden Probanden (RFI = 3,0). Auch die Expression von CD49e auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE war nur etwa halb so stark verglichen mit den Zellen der gesunden Spender und um etwa ein Drittel reduziert gegenüber den Zellen der Patienten mit Pso. Die statistischen Auswertungen zeigten zudem, dass die Expression von CD49e auf den Mo-LC der gesunden Spender durch die Stimulation mit IgE und dessen Kreuzvernetzung um knapp 10 % zurückging.

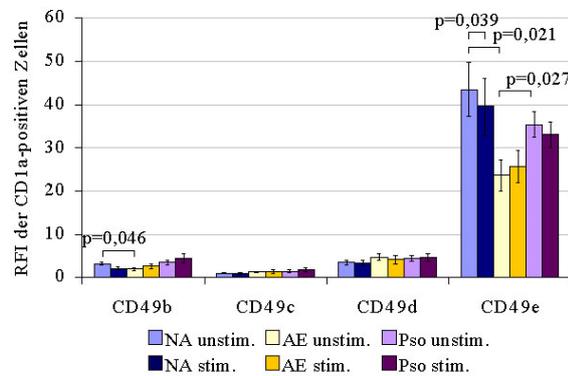


Abbildung 5.14: Expression der α -Ketten CD49b, CD49c, CD49d und CD49e von Integrinen auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

CD49a, CD49b und CD49c wurden auf den Mo-IDEC nicht exprimiert.

Während die Expression von CD49e auf den Mo-IDEC der gesunden Probanden annähernd gleich zur Expression auf den Monozyten war (vgl. Abbildungen 5.12 und 5.15), war der RFI-Wert für CD49d auf ein Viertel des Wertes der Monozyten gesunken. Die Expression von CD49d auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso (RFI = 5,2) war doppelt so stark verglichen mit den Zellen der gesunden Spender (RFI = 2,2) und zwei Fünftel stärker als auf den Mo-IDEC der Patienten mit AE (RFI = 2,9). Beide Unterschiede für die Expression von CD49d auf den unstimulierten Mo-IDEC waren hoch signifikant. Mit diesen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von CD49e auf den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE

um 30 % reduziert war verglichen mit dem RFI-Wert der stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso.

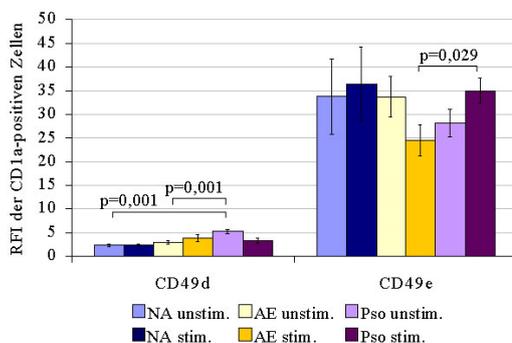


Abbildung 5.15: Expression der α -Ketten CD49d und CD49e von Integrinen auf Mo-IDEC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 11$

Expression der β -Ketten der Integrine

Derzeit ist nur von vier β -Ketten bekannt, dass sie auf Leukozyten exprimiert werden. Dies sind CD18 (β_2), CD29 (β_1), CD61 (β_3) und CD104 (β_4). CD29 interagiert hauptsächlich mit den α -Ketten CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e und CD49f, während CD18 mit den α -Ketten CD11a, CD11b, CD11c und CD11d in Wechselwirkung tritt. Von CD61 sind Heterodimere mit CD41 und dem in dieser Arbeit nicht untersuchten CD51 bekannt und für CD104 ist ein Heterodimer mit dem ebenfalls in dieser Arbeit nicht untersuchten CD49f beschrieben. Im Anhang auf S. XVIII befinden sich zwei herausklappbare Tabellen mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden.

Da bei den durchgeführten Untersuchungen CD104 weder auf den Monozyten noch auf den Mo-LC und Mo-IDEC exprimiert wurde, wird auf die Expression des CD104 nicht weiter eingegangen.

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Populationen der CD18-positiven und CD29-positiven Monozyten homogen waren (vgl. Abbildung 5.16). Die prozentualen Anteile der positiven Monozyten für

die gezeigten Rezeptoren betragen 96 % für CD18 und 98 % für CD29 bei gesunden Spendern. Der prozentuale Anteil CD61-positiver Monozyten betrug 93 % bei gesunden Spendern. Die prozentualen Anteile positiver Zellen bei Patienten mit Pso entsprachen dieser Verteilung. Der prozentuale Anteil CD29-positiver Monozyten von Patienten mit AE war mit 99 % signifikant erhöht im Vergleich zum gesunden Kollektiv (vgl. Abbildung A.7 im Anhang S. VI).

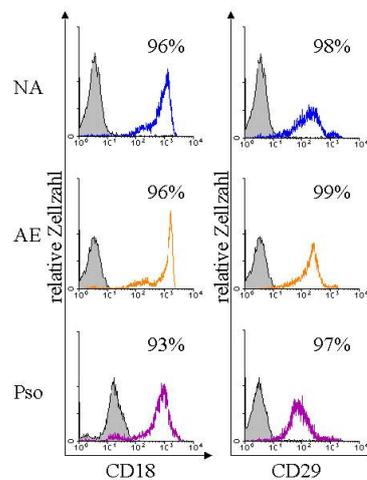


Abbildung 5.16: Expression der β -Ketten CD18 und CD29 von Integrinen auf Monozyten. Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

CD18 (RFI = 156) wurde fast dreimal stärker auf den Monozyten der gesunden Spender exprimiert als CD29 (vgl. Abbildung 5.17). CD61 wurde sogar fast fünfmal stärker auf den Monozyten des gesunden Kollektives exprimiert als CD29. Ein ähnliches Muster zeigte sich auch für die Expression auf den Monozyten der Patienten mit Pso. Auffallend war jedoch, dass CD18 auf den Monozyten der Patienten mit AE hoch signifikant stärker exprimiert wurde als auf den Monozyten der beiden anderen Kollektive. CD18 wurde auf den Monozyten beim AE fast genauso stark exprimiert wie CD61 und damit um den Faktor 1,7 stärker als auf den Monozyten der gesunden Spender und um den Faktor 1,5 stärker verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso.

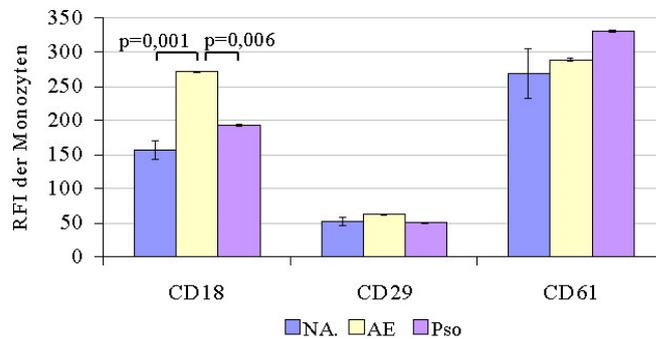


Abbildung 5.17: Expression der β -Ketten CD18, CD29 und CD61 von Integrinen aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 12$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

In Abbildung 5.18 sind Histogramme einer repräsentativen Messung von CD18 und CD61 je Kollektiv für unstimulierte Mo-LC und Mo-IDEC dargestellt. Die Populationen der Mo-DC waren homogen. Die prozentualen Anteile der CD18-positiven und CD29-positiven Zellen waren ebenso hoch bei den Mo-LC und Mo-IDEC gesunder Spender wie bei den Monozyten dieses Kollektives. Jedoch waren die Populationen CD61-positiver Mo-LC und Mo-IDEC des gesunden Kollektives tendenziell um 10 % reduziert im Vergleich zum prozentualen Anteil der Monozyten. Dieses Expressionsmuster wurde auch durch eine Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern bei gesunden Spendern nicht verändert (vgl. Abbildungen A.7 ff. im Anhang ab S. VI).

Die Population CD18-positiver unstimulierter Mo-LC bei der Pso war mit 97 % signifikant stärker als beim gesunden Kollektiv (95 %) (vgl. Abbildung A.8 im Anhang S. VI). Außerdem wurde der prozentuale Anteil CD61-positiver Mo-LC bei der Pso durch eine IgE-Kreuzvernetzung signifikant verringert (von 72 % auf 70 %).

Bei den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE war die Population CD61-positiver Zellen fast ein Zehntel stärker als bei den Zellen der Spender mit Pso (vgl. Abbildung A.9 im Anhang S. VII).

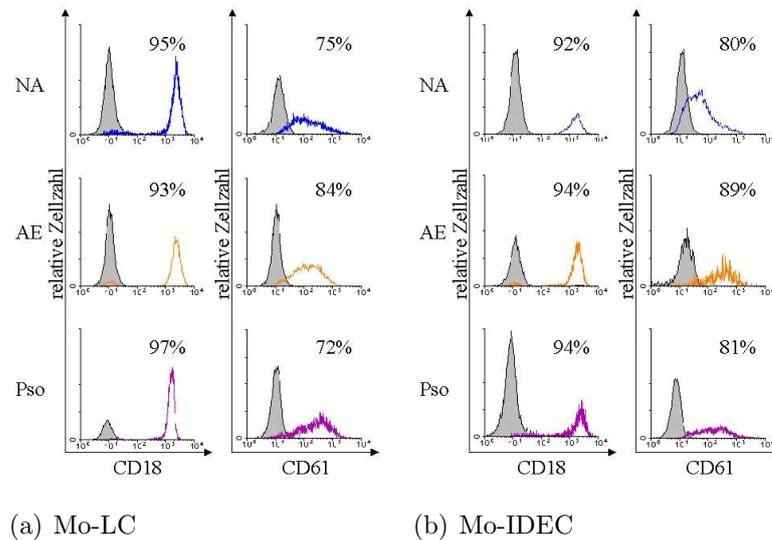


Abbildung 5.18: Expression der β -Ketten CD18 und CD61 der Integrine auf unstimulierten Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

CD18 wurde etwa fünf- bis sechsmal so stark auf den unstimulierten und stimulierten Mo-LC der gesunden Spender exprimiert wie CD29 und CD61 (vgl. Abbildung 5.19). Das bedeutete, dass die starke Expression von CD61 der Monozyten von gesunden Spendern durch die Reifung zu Mo-LC zurückgegangen war (vgl. Abbildung 5.17). Ähnliches zeigte sich auch bei den unstimulierten und stimulierten Mo-LC der beiden Patientengruppen. Die Expression von CD18 auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE war fast ein Viertel schwächer als bei den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso (153 zu 212). Zudem war der RFI von CD29 (RFI = 23) auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso um den Faktor 1,6 erhöht gegenüber den stimulierten Mo-LC der gesunden Spender (RFI = 14). Bei den Mo-LC der Patienten mit Pso war außerdem die Expression von CD29 durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern verringert, während die Expression von CD61 dadurch verstärkt wurde.

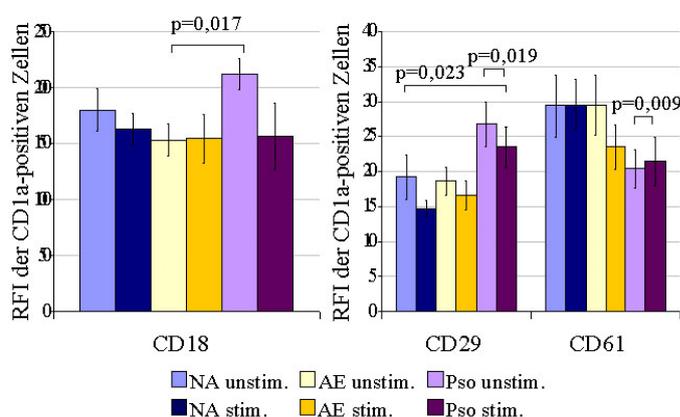


Abbildung 5.19: Expression der β -Ketten CD18, CD29 und CD61 der Integrine auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 13$

Die Mo-IDEC exprimierten wie die Mo-LC sehr viel weniger CD61 als die Monozyten (vgl. Abbildungen 5.17 und 5.20). Bei den Mo-IDEC gesunder Spender war die Expression von CD18 etwa fünfmal stärker als die Expression von CD29 oder CD61. CD18 wurde auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE (RFI = 90) nur knapp halb so stark exprimiert verglichen mit den Zellen der gesunden Spender (RFI = 160), und auch die Expression von CD29 auf den stimulierten Mo-IDEC von Patienten mit AE (RFI = 16) war um rund zwei Fünftel geringer als bei den Zellen der gesunden Spender (RFI = 28). Wie auch schon bei den Mo-LC festgestellt werden konnte, nahm die Expression von CD29 durch die Stimulation der Mo-IDEC mit IgE und anti-IgE-Antikörper bei den Patienten mit Pso signifikant um ein Fünftel ab.

Zusammenfassend wurden beide Ketten des Heterodimers CD11a/CD18 sowie die α -Kette CD49d auf den Monozyten der Patienten mit AE hoch signifikant stärker exprimiert als auf den Monozyten der anderen beiden Kollektive. Die α -Kette CD49a wurde auf den Monozyten der Patienten mit Pso signifikant stärker exprimiert verglichen mit den Monozyten der gesunden Spender.

Auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso wurden beide Ketten

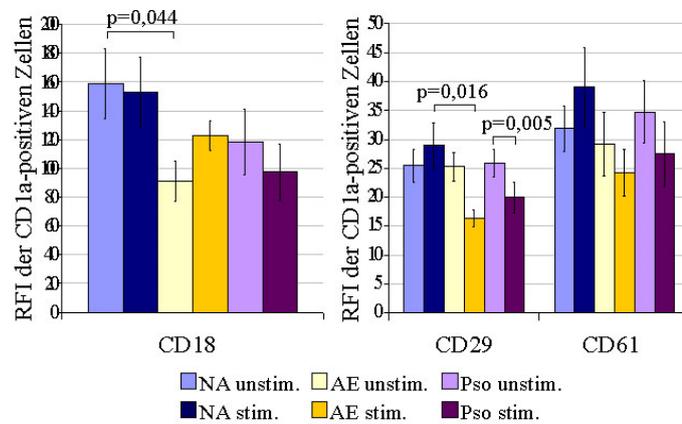


Abbildung 5.20: Expression der β -Ketten CD18, CD29 und CD61 der Integrine auf Mo-IDEC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse. Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 11$, Pso: $n = 12$

des Heterodimers CD11c/CD18 und auf den unstimulierten Mo-LC wurde die α -Kette CD11a stärker exprimiert im Vergleich zu den Zellen der Patienten mit AE. Auch wurde die α -Kette CD49d auf den unstimulierten Mo-LC beider Patientengruppen stärker exprimiert als auf den Zellen der gesunden Probanden. CD49c wurde auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit AE stärker exprimiert als auf den Zellen der gesunden Spender.

CD11a wurde auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE sehr viel schwächer exprimiert als auf den Zellen der Patienten mit Pso. Die Expression von CD41 hingegen war auf den unstimulierten Mo-IDEC bei beiden Patientengruppen signifikant stärker als bei den Zellen der gesunden Spender. Während CD49a, CD49b und CD49c auf den Mo-IDEC nicht exprimiert wurden, wurde CD49d auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso hoch signifikant stärker exprimiert als auf den Zellen der anderen beiden Kollektive.

5.1.3 Expression der Tetraspanine

Tetraspanine sind Rezeptoren, die bei der Verstärkung verschiedener Signale eine Rolle spielen (s. Grundlagen S. 21). In dieser Arbeit wurden sieben

Vertreter (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151) der Tetraspanine untersucht. Von den restlichen 13 Vertretern der Tetraspanine, die auf Zellen des Blutes exprimiert werden, wurde bisher nicht beschrieben, dass sie auf Monozyten oder DC vorkommen. Die Tetraspanine wurden zur besseren Darstellung in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe I umfasst CD9, CD37 und CD53 bei den Darstellungen der Expression auf Monozyten sowie CD9, CD37, CD53 und CD63 bei den Mo-LC und Mo-IDEC (zusammengefasst als Mo-DC). Die zweite Gruppe besteht aus CD63, CD81, CD82 und CD151 bei den Abbildungen für die Monozyten und CD81, CD82 und CD151 bei den Mo-DC. Im Anhang auf S. XIX ff. befinden sich zwei herausklappbare Tabellen mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden.

In Abbildung 5.21 ist die Expression der Tetraspanine CD9, CD37 und CD53 auf Monozyten in Form von Histogrammen dargestellt. Die Populationen der Monozyten waren homogen. Bei gesunden Spendern wurden diese drei Tetraspanine von nahezu allen Monozyten exprimiert. Die Population der CD9-positiven Monozyten der Patienten mit AE war mit 95 % signifikant erhöht gegenüber den anderen beiden Kollektiven (vgl. Abbildung A.10 im Anhang auf S. VIII). Auch die Population CD53-positiver Monozyten der Patienten mit AE war mit 98 % erhöht verglichen mit den Monozyten der Patienten mit Pso (97 %). Andererseits war der prozentuale Anteil CD37-positiver Monozyten der Patienten mit Pso (83 %) um rund 10 % reduziert im Vergleich zu beiden anderen Kollektiven.

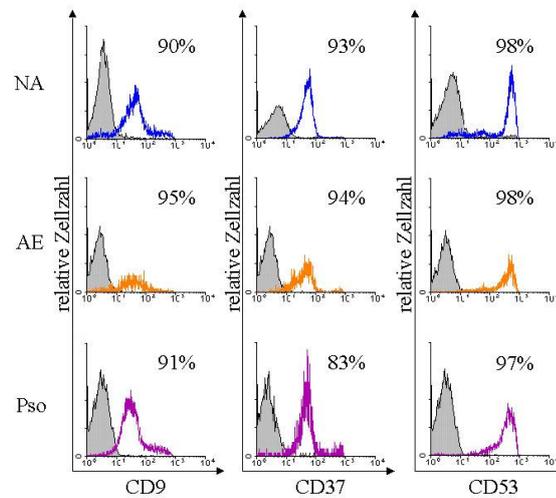


Abbildung 5.21: Expression der Tetraspanine CD9, CD37 und CD53 auf Monozyten (I). Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Die RFI-Werte der Expression von CD9, CD37 und CD53 auf Monozyten sind in Abbildung 5.22 wiedergegeben. CD9 wurde aus dieser Gruppe der Tetraspanine (CD9, CD37, CD53) am stärksten auf den Monozyten der gesunden Spender exprimiert (RFI = 187). Der Wert des RFI für die Expression von CD53 beim gesunden Kollektiv entsprach rund zwei Drittel des Wertes von CD9, während der RFI-Wert für die Expression von CD37 auf den Monozyten der gesunden Probanden auf ein Zehntel des Wertes von CD9 reduziert war. Die Expression von CD9 auf den Monozyten der Patienten mit Pso (RFI = 259) war im Mittel ein Drittel stärker verglichen mit den Monozyten des gesunden Kollektives. Bei den Monozyten der Patienten mit AE war die Expression von CD53 (RFI = 175) signifikant um rund ein Drittel erhöht gegenüber beiden anderen Kollektiven.

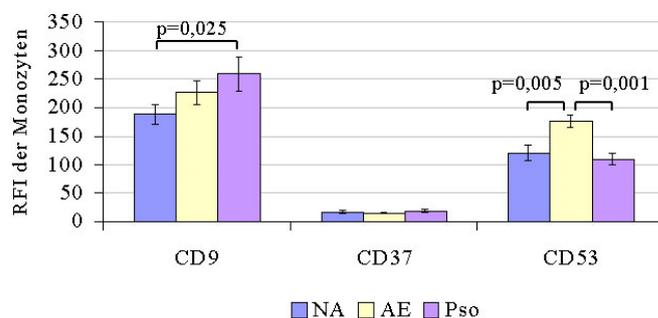


Abbildung 5.22: Expression der Tetraspanine CD9, CD37 und CD53 aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse (I).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 12$, AE: $n = 12$, Pso: $n = 13$

CD37 wurde auf den Mo-DC nicht exprimiert.

Die Histogramme der Expression von CD9 auf unstimulierten Mo-DC sind in Abbildung 5.23 dargestellt. Auch hier waren die Populationen CD9-positiver Zellen homogen. Mit Ausnahme von CD37 wurden CD9, CD53 und CD63 von nahezu allen Mo-LC und Mo-IDEC der gesunden Spender exprimiert ähnlich der Expression auf den Monozyten dieses Kollektives (vgl. Abbildungen A.10 ff. im Anhang ab S. VIII).

Für die prozentualen Anteile CD9-positiver, CD53-positiver und CD63-positiver Mo-LC zeigten sich zwischen den drei Kollektiven weder Unterschiede bei den unstimulierten Zellen noch bei den stimulierten Zellen (vgl. Abbildung A.11 im Anhang). Einzig bei den Mo-LC der Patienten mit AE schien der prozentuale Anteil CD53-positiver Mo-LC durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern, um 5%, bezogen auf den Wert der unstimulierten Mo-LC, zuzunehmen.

Bei den unstimulierten Mo-IDEC hingegen war die Population CD9-positiver Zellen der Patienten mit Pso mit 92% stärker exprimiert verglichen mit dem Wert der CD9-positiven Mo-IDEC der gesunden Spender (87%) (vgl. Abbildung A.12 im Anhang). Bei den stimulierten Mo-IDEC war der prozentuale Anteil CD53-positiver Zellen der Patienten mit Pso (93%) wiederum um 13 Prozentwerte erhöht gegenüber den stimulierten Mo-IDEC der gesunden Pro-

banden (80 %).

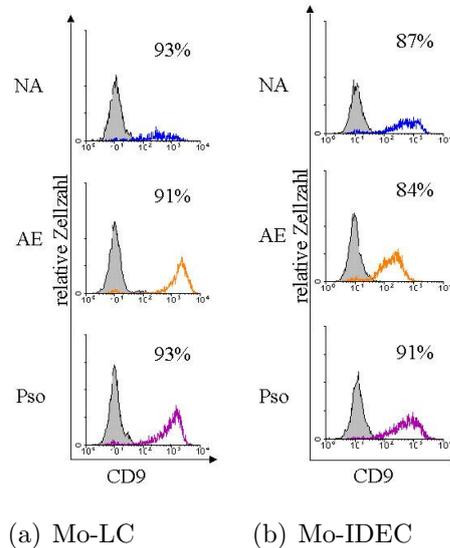


Abbildung 5.23: Expression des Tetraspanins CD9 auf unstimulierten Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b) (I).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Bei gesunden Spendern wurden CD9 (RFI = 89) und CD53 (RFI = 100) ähnlich stark exprimiert, während der Wert des RFI für die Expression von CD63 (RFI = 23) nur knapp ein Viertel des Wertes für die Expression von CD9 betrug (s. Abbildung 5.24). Zudem war die Expression von CD53 auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso (RFI = 49) nur halb so stark verglichen mit den Zellen der gesunden Spender. Dagegen war die Expression von CD53 auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit AE (RFI = 78) um den Faktor 2,5 stärker im Vergleich zu den Zellen der gesunden Spender (RFI = 31). Auch die Expression von CD63 war auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit AE fast doppelt so hoch wie auf den Zellen der Patienten mit Pso. Für die Mo-LC der Patienten mit Pso konnte auch festgestellt werden, dass die Expression von CD9 durch die IgE-Kreuzvernetzung um den Faktor 1,8 reduziert wurde.

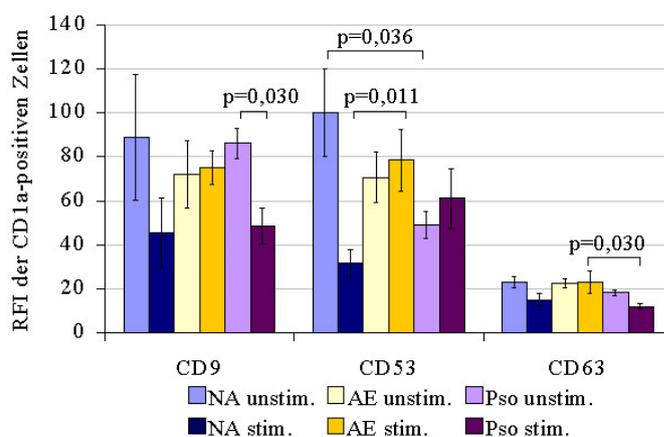


Abbildung 5.24: Expression der Tetraspanine CD9, CD53 und CD63 auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (I).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 15$

Die Expression von CD9 auf den Mo-IDEC der gesunden Spender war auf etwa ein Viertel des Wertes der Monozyten des selben Kollektives reduziert (vgl. Abbildungen 5.22 und 5.25). Die Expression von CD53 und CD63 bei gesunden Spendern war auf etwa die Hälfte reduziert verglichen mit den Monozyten. Wie bei den Mo-LC wurden auch bei den Mo-IDEC CD9 und CD53 etwa gleich stark exprimiert, während der RFI-Wert für CD63 (RFI = 15) bei den Zellen der gesunden Spender nur knapp ein Drittel des Wertes von CD9 (RFI = 48) betrug. Bei den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE war die Expression von CD53 (RFI = 88) um den Faktor 1,6 signifikant stärker gegenüber den anderen beiden Kollektiven. Obwohl für die Expression von CD9 ein ähnliches Expressionsmuster zu sehen war, waren diese Unterschiede nicht signifikant. Die Expression von CD63 auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE (RFI = 19) war um den Faktor 1,5 stärker verglichen mit den Zellen der Patienten mit Pso (RFI = 12). Für die stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso konnte ebenfalls eine doppelt so starke Expression von CD53 festgestellt werden im Vergleich zu den stimulierten Zellen des gesunden Kollektives.

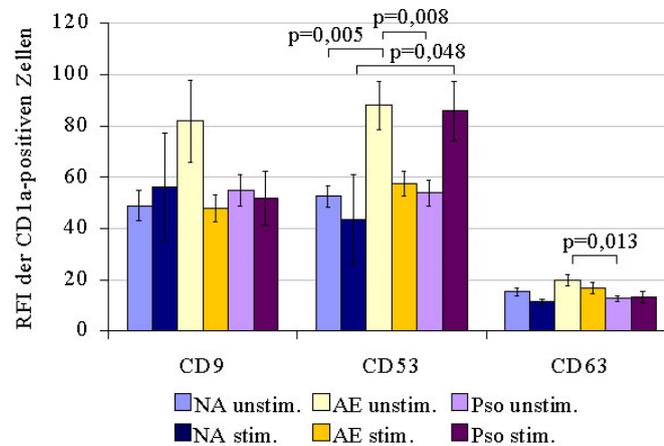


Abbildung 5.25: Expression der Tetraspanine CD9, CD53 und CD63 auf Mo-IDEC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (I).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 7$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 7$

Die Histogramme der zweiten Gruppe untersuchter Tetraspanine (CD63, CD81, CD82, CD151) auf Monozyten sind mit Ausnahme von CD82 in Abbildung 5.26 dargestellt. Die Expression von CD82 auf den Monozyten wird nicht dargestellt, da sich keine Unterschiede zwischen den drei untersuchten Kollektiven ergaben. Die Populationen der CD63-, CD81- und CD151-positiven Monozyten waren bei den drei Kollektiven homogen. Die drei dargestellten Tetraspanine wurden bei gesunden Spendern ebenso wie CD82 auf nahezu allen Monozyten exprimiert (vgl. Abbildung A.10 im Anhang auf S. VIII). Die Population CD63-positiver Monozyten der Patienten mit AE (99%) war signifikant erhöht im Vergleich zum prozentualen Anteil der CD63-positiven Monozyten der Patienten mit Pso und auch gesunden Spendern (jeweils 96%). Der prozentuale Anteil CD151-positiver Monozyten der Patienten mit AE (97%) war ebenfalls höher als der prozentuale Anteil CD151-positiver Monozyten der Patienten mit Pso (94%).

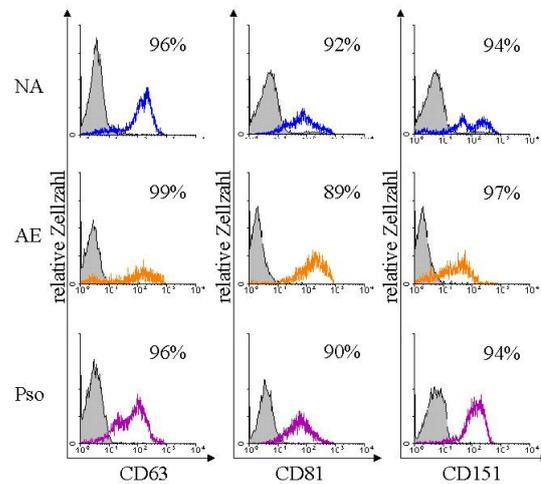


Abbildung 5.26: Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 auf Monozyten (II).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der Monozyten aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Monozyten an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Die RFI-Werte dieser zweiten Gruppe untersuchter Tetraspanine sind ebenfalls mit Ausnahme von CD82 in Abbildung 5.27 dargestellt. Aus dieser Gruppe (CD63, CD81 und CD151) wurde CD63 am stärksten auf den Monozyten der gesunden Spender (RFI = 34) exprimiert. Dieser Wert entsprach dem RFI-Wert der Expression des nicht gezeigten CD82. Die Expression von CD81 und CD151 war verglichen mit der Expression von CD63 nur halb so stark auf den Monozyten der gesunden Probanden. Die Expression von CD63 war um rund ein Drittel stärker auf den Monozyten der beiden Patientengruppen verglichen mit dem gesunden Kollektiv. Dagegen war die Expression von CD81 auf den Monozyten der Patientengruppen (jeweils RFI = 11) rund ein Viertel schwächer gegenüber der Expression auf den Monozyten des gesunden Kollektives (RFI = 15).

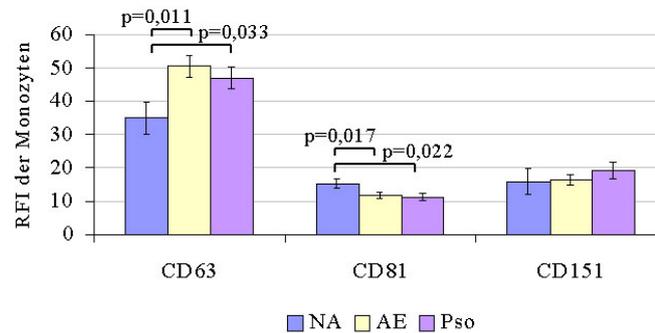


Abbildung 5.27: Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 12$, AE: $n = 12$, Pso: $n = 13$

In Abbildung 5.28 sind die Histogramme der zweiten untersuchten Gruppe der Tetraspanine (CD81, CD82 und CD151) für unstimulierte Mo-LC und Mo-IDEC dargestellt. Die Populationen der Mo-DC für die angegebenen Rezeptoren waren alle homogen. Während der prozentuale Anteil CD81-positiver Zellen bei gesunden Spendern zwischen den Monozyten und den Mo-DC kaum variierte, so dass nahezu alle Zellen für CD81 positiv waren, war der prozentuale Anteil CD82-positiver Zellen bei den Mo-LC nur noch halb so hoch verglichen mit den Monozyten und bei den Mo-IDEC nur noch knapp ein Sechstel so hoch im Vergleich zu den Monozyten (vgl. Abbildungen A.10 ff. im Anhang ab S. VIII). CD151 wurde zwar wie bei den Monozyten von nahezu allen Mo-LC der gesunden Spender exprimiert, jedoch war die Population der CD151-positiven Mo-IDEC um ein Drittel reduziert gegenüber den Monozyten.

Für die unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso war der prozentuale Anteil CD151-positiver Zellen (85 %) um etwa ein Zehntel reduziert verglichen mit den Zellen des gesunden Kollektives (vgl. Abbildung A.11 im Anhang auf S. IX). Die Population CD82-positiver unstimulierter Mo-LC beider Patientengruppen waren nur etwa halb so stark (rund 24 %) wie die Population der gesunden Spender (42 %). Jedoch nahm der prozentuale Anteil CD82-positiver Mo-LC der Patienten mit Pso durch die Stimulation leicht zu (von 24 % auf 27 %).

Sowohl CD81, CD82 als auch CD151 wurden auf den unstimulierten Mo-IDEC von höheren prozentualen Anteilen beider Patientengruppen exprimiert im Vergleich zu den Zellen der gesunden Probanden (vgl. Abbildung A.12 im Anhang auf S. X). Die Population CD81-positiver unstimulierter Mo-IDEC nahm dabei um rund fünf Prozent, bezogen auf den Wert der gesunden Spender, bei beiden Patientengruppen zu. Der prozentuale Anteil CD151-positiver unstimulierter Mo-IDEC war um den Faktor 1,5 bei beiden Patientengruppen höher als bei den gesunden Probanden. Bei den CD151-positiven Mo-IDEC der Patienten mit Pso war der prozentuale Anteil der stimulierten Zellen ebenfalls um den Faktor 1,8 verstärkt. Die stärksten Unterschiede fanden sich jedoch bei den prozentualen Anteilen CD82-positiver Mo-IDEC. Die prozentualen Anteile der unstimulierten Mo-IDEC waren um den Faktor 6 bei den Patienten mit AE (60 %) und um den Faktor 4 bei Patienten mit Pso (40 %) erhöht gegenüber dem gesunden Kollektiv (10 %). Bei den stimulierten Mo-IDEC waren die prozentualen Anteile um den Faktor 3,5 bei beiden Patientengruppen (jeweils 71 %) verglichen mit den Zellen der gesunden Spender (21 %) erhöht. Die Unterschiede zwischen den Mo-IDEC des gesunden Kollektives und den Mo-IDEC der Patienten mit Pso waren für CD82 hoch signifikant.

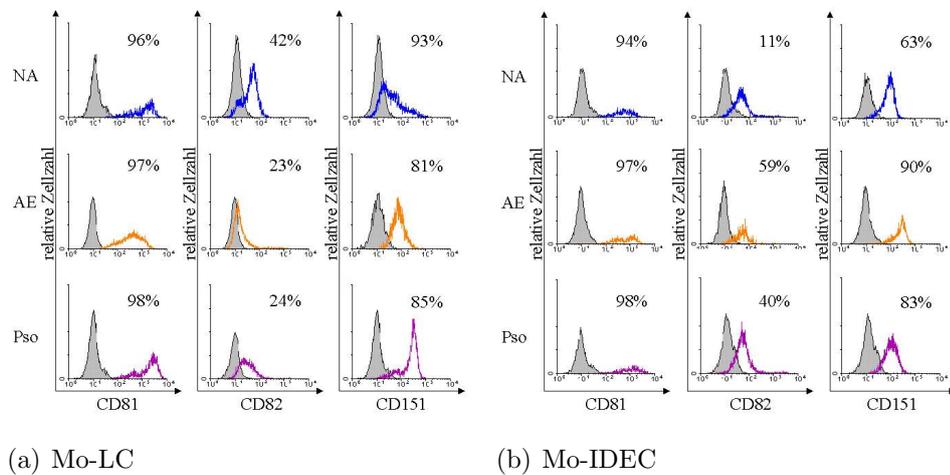


Abbildung 5.28: Expression der Tetraspanine CD81, CD82 und CD151 auf unstimulierten Mo-LC (a) und Mo-IDEc (b) (II).

Die relative Zellzahl ist über der Fluoreszenz-Intensität des angezeigten Antikörpers der CD1a-positiven Zellen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messung je Kollektiv. Die Zahl in der rechten oberen Ecke des Histogrammes zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen an. Kurvenfarben: schwarz und grau hinterlegt = Isotypen-Färbung, blau = NA, orange = AE, magenta = Pso.

Der RFI-Wert der Expression von CD81 war bei den gesunden Spendern etwa siebenmal höher verglichen mit den Monozyten (vgl. Abbildungen 5.27 und 5.29). Dagegen nahm die Expression von CD82 auf den Mo-LC der gesunden Probanden um den Faktor 10 auf einen Wert von 3 ab verglichen mit den Monozyten. Auch die Expression von CD151 bei gesunden Spendern ist auf den Mo-LC nur noch halb so stark wie auf den Monozyten. Der RFI-Wert der stimulierten Mo-LC der Patienten mit AE (RFI = 64) war gegenüber den Zellen des gesunden Kollektives (RFI = 28) mehr als verdoppelt. Zudem nahm die Expression der drei Tetraspanine (CD81, CD82 und CD151) durch die IgE-Kreuzvernetzung auf den Mo-LC der Patienten mit Pso ab. Die RFI-Werte der Patienten mit Pso waren nach der Stimulation für CD81 um zwei Fünftel, für CD82 um ein Fünftel und für CD151 um drei Zehntel reduziert. Ebenso sank die Expression von CD151 auf den Mo-LC der gesunden Probanden auf 60% des Ausgangswertes. Die genauso starke Reduktion der Expression von CD151 auf den Mo-LC der Patienten mit AE, die durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern hervorgerufen wurde, war nicht signifikant.

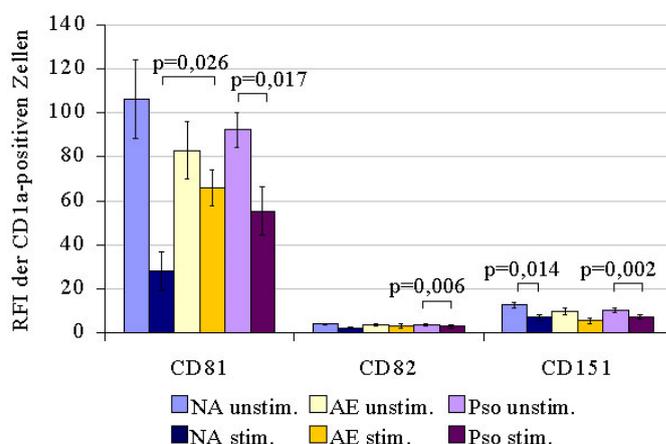


Abbildung 5.29: Expression der Tetraspanine CD81, CD82 und CD151 auf Mo-LC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 15$

Die RFI-Werte der Expression von CD81, CD82 und CD151 auf den Mo-IDEC sind in Abbildung 5.30 dargestellt. Auf den unstimulierten Mo-IDEC der gesunden Spender wurde CD81 etwa dreimal stärker exprimiert verglichen mit der Expression auf den Monozyten (vgl. Abbildung 5.27). Dagegen war die Expression von CD82 auf den Mo-IDEC der gesunden Probanden um den Faktor 15 reduziert und die Expression von CD151 auf diesen Zellen war auf ein Drittel verringert im Vergleich zu den Monozyten. Die RFI-Werte der unstimulierten Mo-IDEC waren bei den Patientengruppen für alle drei Tetraspanine erhöht verglichen mit den Zellen der gesunden Spender. Ein hoch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE (RFI = 12) und den Zellen des gesunden Kollektives (RFI = 5). Auch bei den unstimulierten Zellen der Patienten mit Pso war die Expression von CD151 (RFI = 9) knapp doppelt so stark verglichen mit den Zellen der gesunden Probanden. Auf den stimulierten Zellen war die Expression von CD151 bei den Patienten mit Pso (RFI = 14) um den Faktor 3,5 gesteigert gegenüber den Zellen der gesunden Spender (RFI = 4). Die Expression von CD82 war auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE um den Faktor 3,5 und bei den Patienten mit Pso um den Faktor 2,4 höher im Vergleich zum gesunden

Kollektiv. Die Expression von CD82 war auf den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso um den Faktor 3,3 höher gegenüber den Zellen der gesunden Probanden. Die meisten Unterschiede zeigten sich jedoch für das Expressionsmuster von CD81. Die Expression von CD81 auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso (RFI = 92) war verdoppelt verglichen mit der Expression auf den Zellen der gesunden Probanden (RFI = 46). Dieser Unterschied war hoch signifikant. Der RFI-Wert der unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE (RFI = 77) war um den Faktor 1,6 höher verglichen mit den Zellen des gesunden Kollektives. Die RFI-Werte von CD81 der stimulierten Mo-IDEC beider Patientengruppen (jeweils RFI = 50) waren um den Faktor 2,5 höher im Vergleich zu den Zellen der gesunden Kontrolle (RFI = 20). Zusätzlich wurde die Expression von CD81 auf den Mo-IDEC der Patienten mit Pso durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern um die Hälfte reduziert.

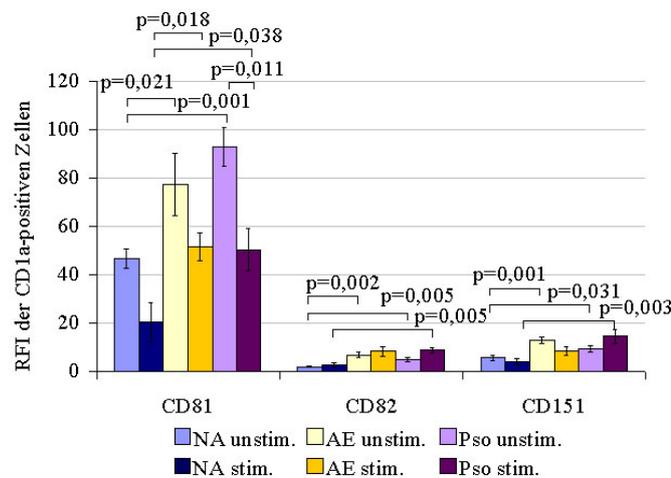


Abbildung 5.30: Expression der Tetraspanine CD81, CD82 und CD151 auf Mo-IDEC aufgetragen in Werten des RFI der CD1a-positiven Zellen auf der y-Achse (II).

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 11$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 12$

Zusammenfassend wurde CD37 auf den Monozyten der Patienten mit Pso geringer exprimiert als auf beiden anderen Kollektiven, während CD53 auf den Monozyten der Patienten mit AE und CD63 auf den Monozyten beider Patientengruppen stärker exprimiert wurde verglichen mit den Monozyten der

gesunden Spender.

Sowohl auf den unstimulierten als auch auf den stimulierten Mo-IDEc beider Patientengruppen wurden CD81, CD82 und CD151 stärker exprimiert als auf den Zellen der gesunden Spender. Auf den unstimulierten Mo-LC der Patientengruppen hingegen wurde CD82 schwächer exprimiert als auf den Zellen der gesunden Spender.

5.1.4 Expression der Fc-Rezeptoren für IgE und IgG auf Monozyten

Fc-Rezeptoren werden auf einigen Zellen des Immunsystems (wie Mastzellen, Makrophagen und DC) exprimiert. Die Bindung der Fc-Region eines Antigen-gebundenen Immunglobulins an den Fc-Rezeptor zusammen mit weiteren Signalen führt zu einer Aktivierung der Zelle, so dass verschiedene Kinasen freigesetzt werden. Von Monozyten kann ein Antigen durch die Bindung an den Fc-Rezeptor besser aufgenommen werden.

In dieser Arbeit wurde die Expression des hoch- und des niedrigaffinen Rezeptors für IgE, (Fc ϵ RI und Fc ϵ RII/CD23), sowie des hoch-, mittel- und niedrigaffinen Rezeptors für IgG (Fc γ RI/CD64, Fc γ RII/CD32 und Fc γ RIII/CD16) ausschließlich auf Monozyten untersucht. Da sich für die Expression von Fc γ RI/CD64 und Fc γ RIII/CD16 keine Unterschiede zwischen den Kollektiven ergaben, sind die Daten ihrer Expression nicht dargestellt. Eine herausklappbare Tabelle mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden befindet sich im Anhang auf S. XX.

Die Monozyten der gesunden Spender exprimierten kaum den hochaffinen Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI) (28 % positive Zellen, vgl. Abbildung A.13 im Anhang auf S. XI). Der niedrigaffine Rezeptor für IgE (Fc ϵ RII/CD23) wurde von knapp der Hälfte der Monozyten der gesunden Spender exprimiert und der mittelaffine Rezeptor für IgG (CD32) wurde von nahezu allen Monozyten exprimiert. Ebenso wurde der hochaffine Rezeptor für IgG (CD64) von nahezu allen Monozyten exprimiert, während nur knapp die Hälfte der Monozyten den niedrigaffinen Rezeptor für IgG (CD16) exprimierten (Daten nicht gezeigt). Die Expression von CD16 kann auf die Existenz verschiedener Subtypen zurück-

geführt werden. Es gibt sowohl Monozyten-Subtypen, die CD16 und CD14 exprimieren, als auch nur CD16 oder nur CD14. Durch die Beschränkung auf CD14-positive Monozyten wird ein Teil der CD16-positiven Monozyten nicht erfasst.

Die in Abbildung 5.31 dargestellten Werte des RFI zeigten eine kaum vorhandene Expression des $Fc\epsilon RI$ ($RFI = 1,4$) auf den Monozyten der gesunden Spender. CD23 wurde auf den Monozyten der gesunden Probanden knapp 2,5-fach stärker und CD32 wurde fast zehnmal stärker exprimiert als der $Fc\epsilon RI$. Der $Fc\epsilon RI$ wurde auf den Monozyten der Patienten mit AE mehr als zehnmal stärker exprimiert verglichen mit dem gesunden Kollektiv. Die Expression des $Fc\epsilon RI$ auf den Monozyten der Patienten mit Pso war hoch signifikant um den Faktor 2,5 verstärkt im Vergleich zu Zellen der gesunden Spender. CD23 war außerdem auf den Monozyten der Patienten mit AE mehr als doppelt so stark exprimiert verglichen mit beiden anderen Gruppen.

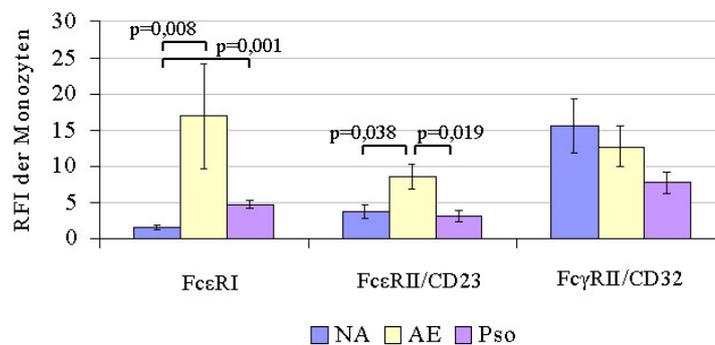


Abbildung 5.31: Expression des $Fc\epsilon RI$, CD23 sowie CD32 aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse.

Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 7$, Pso: $n = 10$

5.1.5 Expression von MHC-Molekülen auf Monozyten

Ein Antigen wird im Kontext der Rezeptoren des Haupthistokompatibilitäts-Komplex der Klasse I oder Klasse II (MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II) auf den APC den T-Zellen präsentiert. Es ist bekannt, dass Monozyten sowohl Re-

zeptoren der MHC-Klasse I als auch Klasse II exprimieren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Monozyten beider Patientengruppen mehr Rezeptoren der MHC beider Klassen exprimieren und so T-Zellen besser aktivieren können. Es wurde in dieser Arbeit die Expression der Rezeptoren der MHC-Klasse I mit dem Antikörper W6/32 untersucht. Die Rezeptoren der MHC-Klasse II wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen HLA-DR sowie CD74, der assoziierten invarianten Kette der Rezeptoren der MHC-Klasse II, untersucht. Eine herausklappbare Tabelle mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden befindet sich im Anhang auf S. XX.

Nahezu alle Monozyten der gesunden Spender exprimierten die Rezeptoren der MHC-Klasse II (HLA-DR), da jedoch keine Unterschiede zwischen den drei Kollektiven gefunden wurden, wird die Expression hier nicht weiter dargestellt. Sowohl die Rezeptoren der MHC-Klasse I als auch Klasse II wurden auf den Monozyten der gesunden Probanden exprimiert (jeweils RFI = 31) (vgl. Abbildung A.14(a) im Anhang auf S. XII). CD74 wurde fast nicht auf den Monozyten exprimiert (RFI = 0,8). Sowohl die Rezeptoren der MHC-Klasse I als auch CD74 wurden hingegen auf den Monozyten der Patienten mit Pso doppelt so stark exprimiert verglichen mit der Gruppe gesunder Probanden. Nahezu alle Monozyten der gesunden Spender (85 %) exprimierten die Rezeptoren der MHC-Klasse I (s. Abbildung 5.32), wie auch die Rezeptoren der MHC-Klasse II (Daten nicht gezeigt). Die invarinate Kette der Rezeptoren der MHC-Klasse II (CD74) wurde auf den Monozyten der gesunden Probanden kaum (6 %) exprimiert. Der prozentuale Anteil der Monozyten, der für die Rezeptoren der MHC-Klasse I positiv war, war bei beiden Patientengruppen deutlich erhöht (jeweils 96 %) gegenüber dem gesunden Kollektiv. Auch der prozentuale Anteil der CD74-positiven Monozyten der Patienten mit Pso war hoch signifikant höher und der Patienten mit AE um den Faktor 4,5 höher als die Population der gesunden Spender.

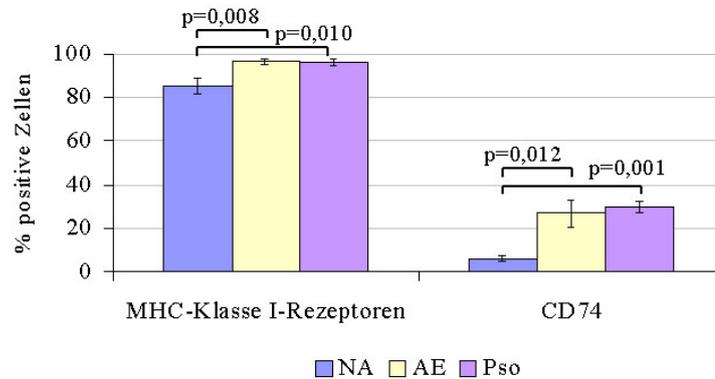


Abbildung 5.32: Expression der Rezeptoren des MHC aufgetragen in prozentualen Werten der Monozyten auf der y-Achse.

Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 13$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 11$

5.1.6 Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf Monozyten

Die Präsentation von Antigenen im MHC reicht nicht aus, um T-Zellen zu aktivieren. Hierfür werden zusätzliche Rezeptoren benötigt - so genannte kostimulatorische Rezeptoren. In dieser Arbeit wurden CD80 und CD86 aus der Ig-Supergenfamilie (früher B7.1 und B7.2 genannt) und CD40 untersucht. Eine herausklappbare tabellarische Übersicht mit den erhaltenen signifikanten Unterschieden befindet sich im Anhang auf S. XX.

CD80 wurde auf den Monozyten nicht exprimiert. Die Rezeptoren CD86 und CD40 wurden schwach auf den Monozyten der gesunden Probanden exprimiert (jeweils RFI = 6) (vgl. Abbildung A.14(b) im Anhang auf S. XII). Auf den Monozyten der Patienten mit Pso war die Expression von CD40 um ein Drittel geringer verglichen mit dem gesunden Kollektiv.

In Abbildung 5.33 sind die Anteile der positiven Monozyten für die kostimulatorischen Rezeptoren wiedergegeben. CD86 wurde von nahezu allen Monozyten der gesunden Spender exprimiert (86%), während CD40 nur von 75% der Monozyten der gesunden Spender exprimiert wurde. Der prozentuale Anteil CD86-positiver Monozyten der Patienten mit Pso war mit 92% signifikant stärker verglichen mit dem gesunden Kollektiv, während nur knapp die Hälfte

der Monozyten bei Patienten mit Pso für CD40 positiv war (39%). Die Unterschiede bei der Expression dieser Rezeptoren auf den Monozyten der Patienten mit AE sind nicht signifikant.

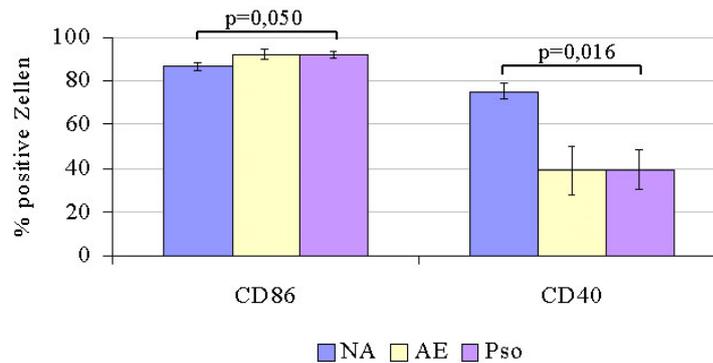


Abbildung 5.33: Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD86 und CD40 aufgetragen in prozentualen Werten der Monozyten auf der y-Achse.

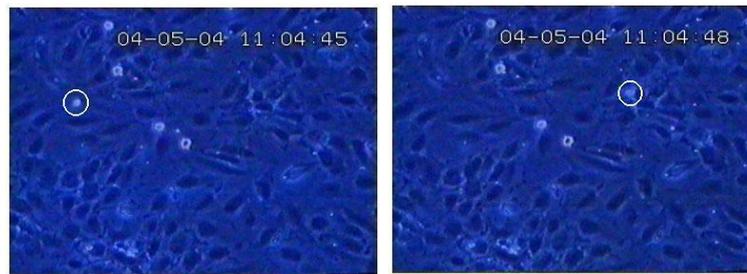
Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 11$, AE: $n = 8$, Pso: $n = 11$

5.2 Adhäsionsversuche mit DC

In weiteren Versuchen sollten Migration und Adhäsionsverhalten von Mo-LC und Mo-IDEC direkt untersucht werden. Da nicht auszuschließen ist, daß DC auch durch den Blutstrom zu einem bestimmten Gewebe transportiert werden, wurde das Verhalten der Mo-LC und Mo-IDEC in laminarer Strömung untersucht [Weber et al., 1999]. Der Versuchsaufbau ist im Kapitel zu den Materialien und Methoden auf S. 44 ff. beschrieben.

Mo-IDEC und Mo-LC von gesunden Spendern und von Spendern mit AE oder Pso wurden in einer laminaren Strömung über humane dermale mikrovaskuläre Epithelzellen (HDMEC) geleitet. Um einen entzündlichen Prozess des Gewebes zu simulieren, wurden die Epithelzellen über Nacht mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β vorstimuliert. Die Versuche wurden mittels eines Mikroskopes mit angeschlossener Videokamera aufgenommen. Den erhaltenen Bildern konnte sowohl die Anzahl adhärierter Zellen als auch langsam rollender Zellen entnommen und ausgewertet werden (s. Abbildung 5.34).

Dafür wurden die Zellen in mindestens acht Feldern mit einer Größe von $0,25\text{ mm}^2$ ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Eine CD mit repräsentativen Filmausschnitten befindet sich im Anhang auf S. XIII.



(a) Rollende Mo-LC

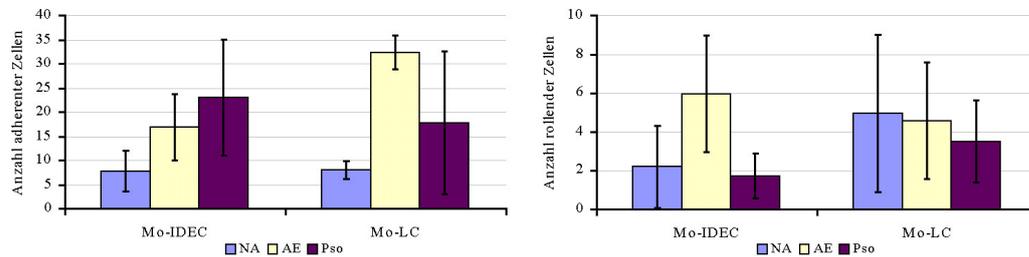
(b) Adhäsion 3 sec später

Abbildung 5.34: Bilder der Adhäsionsversuche von Mo-DC auf Epithelzellen. Mit einem weißen Kreis ist eine unstimulierte Mo-LC eines Patienten mit Pso zu sehen, die über die Epithelzellen rollt (a) und 3 sec später an den Epithelzellen adhärert (b).

Im blauen Untergrund sind die HDMEC zu sehen, die über Nacht mit $\text{IL-1}\beta$ vorstimuliert wurden. Die Beschriftung in den Bildern stammt aus dem Film und gibt das Datum und die Zeit an (s. Datei *Pso-LC* auf der beigefügten CD im Anhang auf S. XIII).

Die Auswertung der Anzahl adhärierter Zellen bei unstimulierten Mo-IDEC und Mo-LC zeigte, dass die Mo-IDEC der Patienten mit AE tendenziell stärker als die Zellen der gesunden Probanden adhärten (Abbildung 5.35(a)). Die Mo-IDEC der Patienten mit Pso wiederum adhärten tendenziell stärker an den Epithelzellen als die Zellen der beiden anderen Kollektive. Bei den Mo-LC adhärten die Zellen der Patienten mit AE tendenziell stärker als beide andere Kollektive.

Bei der Auswertung der Anzahl rollender Zellen auf den Epithelzellen zeigte sich, dass die Mo-IDEC der Patienten mit AE am stärksten rollten, während die Anzahl rollender Mo-IDEC bei den Patienten mit Pso und gesunden Spendern etwa identisch war (Abbildung 5.35(b)). Beim Vergleich der Anzahl rollender Mo-LC konnte bei den drei Kollektiven kein Unterschied festgestellt werden.



(a) Adhärenente Mo-DC

(b) Rollende Mo-DC

Abbildung 5.35: Anzahl adhärrierter und langsam rollender Mo-IDEC und Mo-LC von gesunden Spendern (NA), Patienten mit AE oder Pso auf Epithelzellen bei laminarer Strömung.

Die Anzahl der adhärrierten Zellen (a) und der langsam rollenden Zellen (b) wurde auf $0,25 \text{ mm}^2$ anhand von mindestens acht Bildern je Versuch bestimmt und der Mittelwert berechnet. NA: $n = 3$, AE: $n = 3$, Pso: $n = 4$

5.3 Expression von Cytohesin-1

Auf Grund der Befunde, dass CD11a/CD18 auf Monozyten, Mo-IDEC und Mo-LC der Patientenkollektive stärker exprimiert wurde, wurde die Expression von Cytohesin-1 in diesen Zellen untersucht. Cytohesin-1 ist ein cytoplasmatisches Protein und interagiert mit CD11a/CD18 (LFA-1). Es verstärkt die Interaktion des CD11a/CD18 von T-Zellen mit ICAM-1 von APC [Kolanus et al., 1996]. Es wird vermutet, dass nicht nur bei T-Zellen die Zell-Zell-Adhäsion durch LFA-1 verstärkt wird, sondern auch bei anderen Zellen, die LFA-1 exprimieren (z. B. den dendritischen Zellen und den Monozyten).

Aus den isolierten Monozyten wurden Mo-LC und Mo-IDEC kultiviert. Ein Teil der Mo-LC und Mo-IDEC wurde mit Myeloma-IgE und anti-IgE-Antikörpern behandelt (s. S. 43 im Kapitel Materialien und Methoden). Zur Vereinfachung werden die so behandelten Zellen im Folgenden stimulierte Zellen genannt.

Zum Nachweis der Expression des Cytohesin-1 wurden die Monozyten, die unstimulierten und stimulierten Mo-LC und Mo-IDEC lysiert. Zum Trennen der Proteine wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die getrennten Proteine anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran überführt.

Cytohesin-1 wurde mit einem Ratte-anti-Cytohesin-1 Antikörper (2D7) nachgewiesen. Als interner Standard wurde Actin gewählt. Die Blots wurden zuerst auf Cytohesin-1 untersucht, danach wurde der gebundene Antikörper wieder entfernt und Actin detektiert.

In Abbildung 5.36 sind exemplarisch einige Blots der Detektionen von Cytohesin-1 und Actin dargestellt. Cytohesin-1 wurde in Mo-LC und Mo-IDEC sehr stark exprimiert.

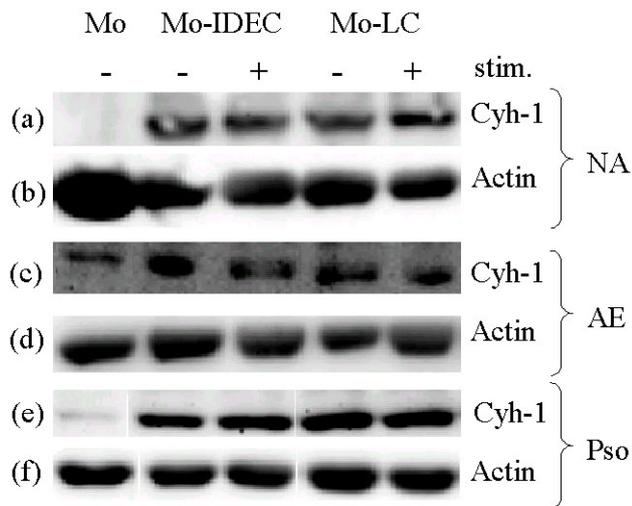


Abbildung 5.36: Western-Blot zum Nachweis von Cytohesin-1 (Cyh-1) in Monozyten (Mo), Mo-IDEC und Mo-LC von einem gesunden Spender (NA, a und b), einem Spender mit AE (c und d) sowie einem Spender mit Pso (e und f).

Die Zellen waren unstimuliert (-) oder mit Myeloma-IgE und anti-IgE-Antikörpern (zum Kreuzvernetzen des Myeloma-IgEs) behandelt (+), anschließend wurden sie lysiert, mit einer SDS-PAGE wurden die Proteine getrennt und mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen. In (a), (c) und (e) ist die Detektion von Cytohesin-1 durch den Antikörper 2D7 gezeigt. In (b), (d) und (f) ist der Nachweis von Actin als interner Standard dargestellt. Beladung von links nach rechts: Spur 1: Monozyten (Mo), Spur 2: unstim. Mo-IDEC, Spur 3: stim. Mo-IDEC, Spur 4: unstim. Mo-LC und Spur 5: stim. Mo-LC.

Zum Verifizieren dieser Aussagen wurden die Versuche mit Zellen von drei gesunden Spendern, fünf Patienten mit AE und acht Patienten mit Pso wiederholt. Die Blots wurden in einem ECL-Detektionsgerät eingelesen und die Ergebnisse mit Hilfe des Programmes AIDA ausgewertet. Um die Ergebnisse verschiedener Blots miteinander vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Werte beim Nachweis von Cytohesin-1 auf die dazugehörigen Werte der Actin-

Detektion bezogen. Die so errechneten Werte werden als relative Flächeneinheit (rel. Flächeneinheit) bezeichnet (s. a. Kapitel Material und Methoden Abschnitt 4.2.6 auf S. 54).

In Abbildung 5.37 sind die relativen Flächeneinheiten für Monozyten, unstimulierte und stimulierte Mo-LC und Mo-IDEC aufgetragen. Cytohesin-1 war in Monozyten von Patienten mit AE im Vergleich zu Monozyten von Patienten mit Pso signifikant stärker exprimiert. Auch die Expression in unstimulierten Mo-LC und unstimulierten Mo-IDEC von Patienten mit Pso im Vergleich zu Zellen von gesunden Spendern war signifikant stärker.

Obwohl keine weiteren signifikanten Unterschiede der Expression zwischen den drei Kollektiven festgestellt wurden, zeigt die Abbildung, dass Cytohesin-1 sowohl in Mo-LC als auch in Mo-IDEC im unstimulierten und stimulierten Zustand bei beiden Patientenkollektiven stärker exprimiert wurde als beim gesunden Kollektiv.

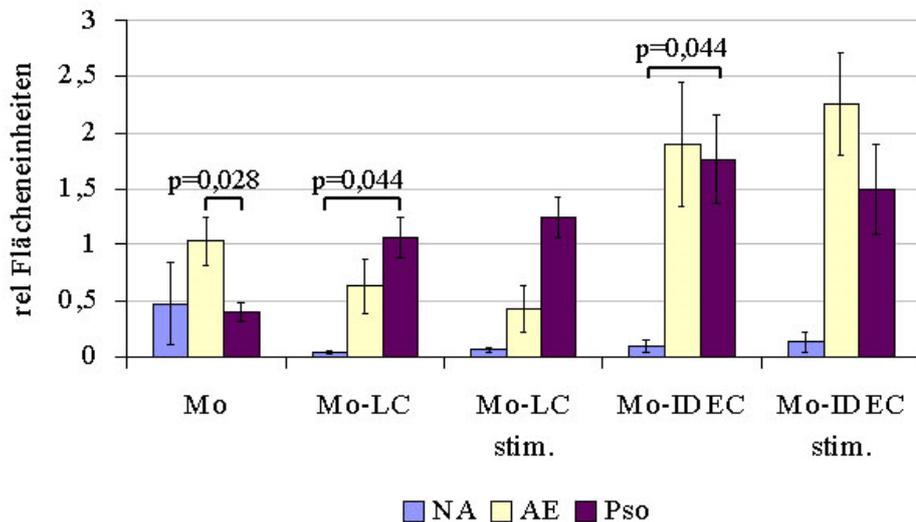


Abbildung 5.37: Diagramm zur Expression von Cytohesin-1 bei verschiedenen Zelltypen. Der Nachweis zur Expression von Cytohesin-1 wurde mehrfach durchgeführt und quantifiziert. Um die erhaltenen Werte des Schwärzungsgrades bei der Detektion von Cytohesin-1 verschiedener Blots miteinander vergleichen zu können, wurden diese Werte auf die Werte der Actin-Kontrolle bezogen. Die errechneten Werte wurden relative (rel.) Flächeneinheiten bezeichnet. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 3$, AE: $n = 5$, Pso: $n = 8$

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass CD81 im Erk/MAPKinase Signalweg involviert ist durch Aktivierung von Typ II Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) [Carlomi et al., 2004]. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob eine Aktivierung von Cytohesin-1 durch einen Antikörper gegen CD81 und einen sekundären Antikörper zur Kreuzvernetzung nachgewiesen werden kann. Dafür wurden nicht denaturierende Bedingungen für die oben aufgeführten Schritte ausgewählt, wodurch eine Phosphorylierung des Proteins mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuche zeigten keine Aktivierung des Cytohesin-1 an, daher soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

5.4 Aufnahme des *Bet v 1*-Allergens

Der Kontakt mit einem Allergen führt beim atopischen Ekzem sowie bei der allergischen Rhinitis und beim allergischen Asthma zum Ausbruch der Erkrankung. Seit einigen Jahren versucht man, Wege zu finden, um das Immunsystem dieser Patienten an das Allergen zu gewöhnen. Von verschiedenen häufig vorkommenden Allergenen wurde beschrieben, dass die Verwendung von chemischen Abkömmlingen des Allergens zu einer Milderung der Erkrankung führen kann. Dies wurde auch für das Hauptallergen der Birkenpolle (*Bet v 1*) beschrieben [Vrtala et al., 1997, Vrtala et al., 2001]. Bedingung für den therapeutischen Einsatz eines chemischen Abkömmlings ist der nachweisliche Einfluss auf das Immunsystem ohne jedoch einen anaphylaktischen Schock auszulösen. Beim Birkenpollenallergen *Bet v 1* wurden sowohl von einem Trimer des Allergens als auch von zwei Teilstücken (jeweils eine Hälfte des Allergens) eine therapeutische Wirkung beschrieben [Vrtala et al., 2000, Vrtala et al., 2001]. Der Aufbau der Fragmente des *Bet v 1* und des Trimer stehen im Kapitel Materialien und Methoden auf S. 45 beschrieben.

Für die folgenden Untersuchungen waren *Bet v 1*, sowie die Teilstücke und das Trimer mit FITC gekoppelt. Die Zellen wurden nach sieben Tagen Kultivierung mit spezifischem IgE für *Bet v 1* und anschließend mit dem kompletten Allergen, einem von beiden Fragmenten des Allergens oder dem Trimer des

Bet v 1 inkubiert. Nach der Entfernung überschüssigen *Bet v 1* aus der Zellsuspension wurden nach 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 4,5 h, 6 h und 22 h Proben genommen und mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen die Fluoreszenz-Intensität auf den Zellen untersucht. Zur Detektion von eventuell auftretender Eigenfluoreszenz wurden Proben der unbehandelten Zellen und Proben der Zellen, die mit dem spezifischen IgE inkubiert worden waren, verwendet.

In Abbildung 5.38 sind Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen zum Nachweis von *Bet v 1* auf Mo-LC und Mo-IDEDEC eines Patienten mit AE dargestellt. In einem morphologischen Punktdiagramm (Dot Plot) und einem Dot Plot mit 7AAD (Nachweis von toten Zellen) über CD1a-PE (Marker für dendritische Zellen) wurde die zu untersuchende Population eingegrenzt. Für Mo-LC und Mo-IDEDEC sind daraus resultierende Histogramme mit einigen übereinandergelegten Kurven der Kinetik dargestellt.

Nach 0,5 h bis 1,5 h wurde die stärkste Fluoreszenz-Intensität erhalten und nach 22 h war die Fluoreszenz-Intensität auf den Ausgangswert zurückgegangen. Anstelle einer Isotypenkontrolle wurden die erhaltenen Werte der Messungen mit Zellen, die nur mit *Bet v 1*-spezifischem IgE vorbehandelt wurden, als Kontrollwerte verwendet.

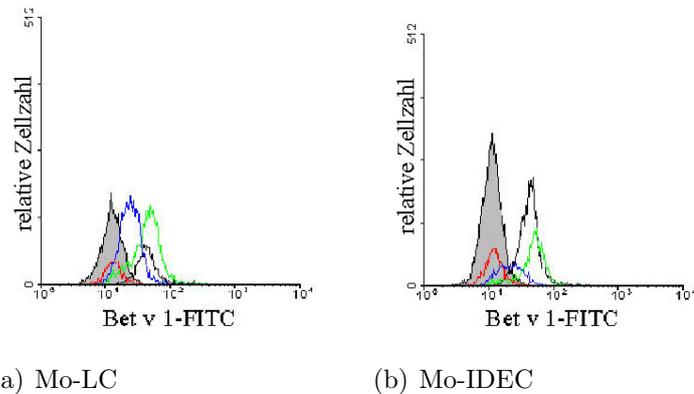
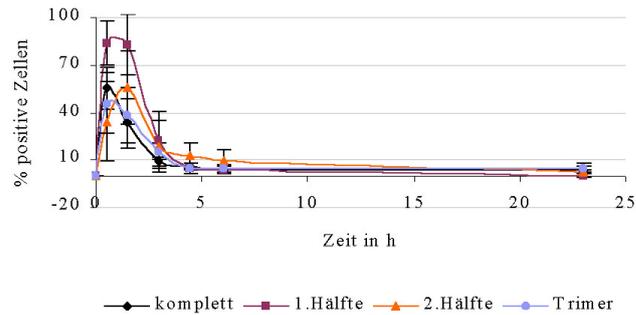


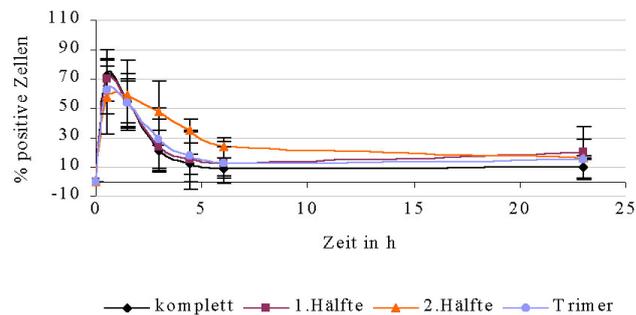
Abbildung 5.38: Histogramme von *Bet v 1*-FITC auf Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b) eines Patienten mit AE zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die Zellen wurden nach der Reifung mit spezifischem IgE und FITC-gekoppeltem *Bet v 1* inkubiert und anschließend auf die Fluoreszenz-Intensität untersucht. Dargestellt sind die Histogramm-Kurven zu verschiedenen Zeitpunkten. Kurvenfarben: schwarz und grau unterlegt = Zelle nur mit IgE inkubiert, schwarz = nach 0,5 h Inkubation mit *Bet v 1* (Startpunkt), grün = nach 1,5 h Inkubation mit *Bet v 1*, blau = nach 3 h Inkubation mit *Bet v 1*, rot = nach 22 h Inkubation mit *Bet v 1*.

Es wird davon ausgegangen, dass beim atopischen Ekzem spezifisches IgE an ein Allergen bindet. Die dendritischen Zellen beim atopischen Ekzem nehmen das Allergen nach der Stimulation des hochaffinen IgE Rezeptors ($Fc\epsilon RI$) durch daran bindendes IgE auf. Auch die Stimulation des niedrigaffinen IgE Rezeptors CD23 durch Allergen-gebundenes IgE kann eine Allergenaufnahme fördern. In Abbildung 5.39 sind die Daten der Aufnahme des FITC-gekoppelten *Bet v 1* sowie der Fragmente und des Trimers durch Mo-LC und Mo-IDEC von Patienten mit AE gezeigt. Es konnten keine Unterschiede in der Aufnahmegeschwindigkeit zwischen dem kompletten Allergen, einer seiner beiden Hälften und dem Trimer festgestellt werden. Auch zwischen den Zelltypen Mo-LC und Mo-IDEC konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Das Selbe wurde auch bei Zellen der Patienten mit Pso und gesunden Spendern beobachtet (Daten nicht gezeigt).



(a) Mo-LC



(b) Mo-IDEC

Abbildung 5.39: Diagramme zur Aufnahme des FITC-gekoppelten Allergens *Bet v 1*, seiner beiden Teilstücke sowie des Trimer von Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b) bei Patienten mit AE.

Die Zellen wurden nach der Reifung mit spezifischem IgE und FITC-gekoppeltem *Bet v 1*, einem seiner beiden Teilstücke oder dem Trimer inkubiert und anschließend auf die Fluoreszenz-Intensität untersucht. Dargestellt sind die Werte der prozentualen Anteile der CD1a-positiven Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Inkubation mit dem Allergen, seiner Fragmente oder dem Trimer.

6 Diskussion

6.1 Vor- und Nachteile des Zellsystems

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Phänotypisierung und der Vergleich von Monozyten und antigen-präsentierenden Zellen der Haut bei atopischem Ekzem (AE) und Psoriasis vulgaris (Pso). Beide Erkrankungen treten häufig in den westlichen Industrienationen auf, doch ist der Pathomechanismus bei beiden Erkrankungen noch nicht vollständig geklärt. Während beim AE die Expression des Fc ϵ RI und Fc ϵ RII auf dendritischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen und damit bei der Unterhaltung der Erkrankung spielt, ist bei der Pso der auslösende Faktor für die Aktivierung der T-Zellen nicht eindeutig geklärt [Bieber et al., 2000, Leung and Bieber, 2003, Novak et al., 2004].

Durch die geringe Verfügbarkeit der inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) und Langerhans Zellen (LC), wenn sie direkt aus der Haut isoliert werden, wurden für diese Arbeit die Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes kultiviert [Reich et al., 2001, Novak et al., 2002b]. Dadurch war es möglich, Mo-IDEC und Mo-LC in ausreichend großer Menge und Reinheit zu erhalten. Jedoch ist es umstritten, ob sich aus Monozyten *in vitro* generierte DC tatsächlich immer wie originär isolierte DC verhalten. Für die untersuchten Subpopulationen der DC (IDEC und LC) wurden Vergleiche von Expressionsmustern einiger Oberflächenrezeptoren zwischen frisch aus der Haut isolierten DC und aus Monozyten generierten Mo-LC und Mo-IDEC beschrieben [Novak et al., 2004]. Diese Untersuchungen zeigten eine starke Ähnlichkeit der *in vitro* kultivierten Mo-IDEC und Mo-LC mit den aus der Haut isolierten IDEC und LC.

6.2 Phänotypen beim AE und bei der Pso

Zur Phänotypisierung der Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC von Patienten mit AE oder Pso sowie gesunden Spendern wurde die Expression von Selekti-

nen und Integrinen untersucht, da sie eine wesentliche Rolle bei der Wanderung der Zellen aus dem Blutstrom ins Gewebe sowie der Wanderung im Gewebe haben. Zudem wurde die Expression der Tetraspanine auf diesen drei Zelltypen untersucht. Tetraspanine haben eine signalverstärkende Wirkung. Auf den Monozyten wurde außerdem auch die Expression einiger Fc-Rezeptoren sowie einiger kostimulatorischer Rezeptoren und der Moleküle des MHC-Klasse I und -Klasse II untersucht. Durch diese Untersuchungen können Aussagen zur Fähigkeit der Allergenaufnahme wie auch der Allergenpräsentation erhalten werden.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen erhält man Werte zum prozentualen Anteil der positiven Zellen für den jeweiligen untersuchten Antikörper. Je mehr Zellen diesen Rezeptor exprimieren, desto stärker kann die zelluläre Antwort auf Grund einer Stimulation dieses Rezeptors sein. Zudem erhält man bei dieser Untersuchungsmethode auch Werte zur Expressionsstärke des Rezeptors auf einer Zelle (relativer Fluoreszenzindex, RFI). Je stärker ein Rezeptor auf einer Zelle exprimiert wird, desto stärker kann die Reaktion der Zelle auf eine Stimulation dieses Rezeptors sein.

Durch eine Stimulation eines Rezeptors kann sich das Expressionsmuster weiterer Rezeptoren verändern, daher wurden auch die Expressionsmuster der Selektine, Integrine und Tetraspanine nach einer Stimulation der Mo-LC und Mo-IDEC mit IgE und anschließender Kreuzvernetzung untersucht. IgE kann mit dem niedrigaffinen Rezeptor CD23 interagieren, der sowohl auf den Mo-LC als auch auf den Mo-IDEC (zusammengefasst als Mo-DC) der drei Kollektive exprimiert wird. Außerdem exprimieren die Mo-DC der Patienten mit AE auch den hochaffinen Rezeptor für IgE $Fc\epsilon RI$. Die Stimulation kann dazu führen, dass der prozentuale Anteil der positiven Mo-DC für einen weiteren Rezeptor geringer oder stärker wird und / oder dieser Rezeptor geringer oder stärker auf diesen Zellen exprimiert wird. In seltenen Fällen führt die Stimulation mit IgE zur Bildung von zwei Populationen der für diesen Rezeptor positiven Zellen; eine Population, auf der der Rezeptor nur schwach exprimiert wird, sowie einer zweiten Population, auf der der Rezeptor sehr stark exprimiert wird. Das kann dazu führen, dass der prozentuale Anteil der Gesamt-Menge der positiven Zellen geringer wird, während der RFI-Wert der Gesamt-Menge der Zellen steigen

kann.

Im Anhang ab Seite XV befinden sich tabellarische Übersichten der erhaltenen signifikanten ($p \leq 0,050$; ein Pfeil) und hoch signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,001$; zwei Pfeile) für die Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren. Diese tabellarischen Übersichten können herausgeklappt werden, um während des Lesens eine bessere Übersicht über die beschriebenen Phänomene zu behalten.

6.2.1 Die Selektine

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Untersuchungen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC der Patienten mit AE oder Pso eine deutlich veränderte Fähigkeit zur Adhäsion an Endothelzellen und zur Migration im Gewebe haben können.

Das erste deutliche Zeichen dafür ist die Expression der Selektine auf den Monozyten (vgl. tabellarische Darstellung im Anhang auf S. XV). Die verstärkte Expression der Selektine CD62L und CD62P auf den Monozyten der Patienten mit AE im Vergleich zu den beiden anderen Kollektiven könnte zu einem besseren Rollen der Monozyten auf den Endothelzellen der Blutgefäße führen und die Zellen so befähigen, besser in das Gewebe einzuwandern. Durch die stärkere Population CD62L-positiver Zellen kann dieser Effekt verstärkt werden, da mehr Monozyten in einen rollenden Zustand übergehen können.

Es wurde beschrieben, dass die Adhäsion und Extravasation der Leukozyten aus dem Blutgefäß in das umgebende Gewebe bei einer Entzündung stark davon abhängt, welcher Agonist bei der Entstehung der Entzündungsreaktion vorherrscht. So wird das Rollen der Neutrophilen in Flußversuchen durch CD62P und CD62E der Endothelzellen vermittelt, wenn TNF- α der Agonist ist [Kunkel et al., 1997, Bahra et al., 1998]. Kam es jedoch zu einer IL-1 β -Stimulation, wird das Rollen der Leukozyten durch CD62E der Endothelzellen und CD62L der Leukozyten vermittelt [von Andrian et al., 1992, Abbassi et al., 1993, Olofsson et al., 1994]. Die Verkürzung der Ectodomäne von CD62L ist ein wichtiger Schritt zur transendothelialen Migration [Smalley and Ley, 2005]. Diese Verkürzung wird von verschiedenen Enzymen katalysiert und wird von TNF- α und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen

ausgelöst. Die Verkürzung der Ectodomäne bedingt eine Limitierung der Adhäsion von neutrophilen Zellen in der Nähe von entzündetem Gewebe und minimiert die Wanderung von T-Zellen in periphere Lymphknoten, wenn die T-Zellen bereits aktiviert wurden [Venturi et al., 2003, Galkina et al., 2003]. Jedoch zeigen Mäuse, deren Ectodomäne von CD62L nicht verkürzt werden kann, eine verringerte Wanderung von Neutrophilen in entzündetes Gewebe [Venturi et al., 2003]. Da vor allem für das AE beschrieben wird, dass zu Anfang der Erkrankung TNF- α und IL-1 β für die Entzündung einen maßgebenden Einfluß haben, kann die erhöhte Expression von CD62L auf den Monozyten dieser Patienten zu einer Verstärkung des Rollens der Monozyten auf den Endothelzellen der Blutgefäße führen. Gleichzeitig ist dies auch ein Hinweis darauf, dass IL-1 β zu Beginn des Pathomechanismus einen wichtigeren Einfluß auf die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut beim AE haben könnte als TNF- α . Da angenommen wird, dass durch TNF- α und IL-1 β unterschiedliche Signalwege induziert werden, kann die erhöhte Expression beider Botenstoffe bei Patienten mit AE die Fähigkeit der Monozyten, an den Endothelzellen entlang zu rollen, sehr viel stärker erhöhen als bei Patienten mit Pso oder bei gesunden Spendern, deren Monozyten sehr viel schwächer sensitiv auf eine solche Umgebung reagieren würden [Sheikh et al., 2005].

Durch die verstärkte Expression von CD62L auf den Monozyten von Patienten mit AE könnten diese Zellen außerdem besser mit Endothelzellen wechselwirken, auf denen CD34 exprimiert wird. Auch mit dem löslichen Liganden für CD62L, GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), könnten diese Zellen besser interagieren. Durch die höhere Dichte von CD62L auf den Monozyten können sich mehr kleine Ansammlungen („Cluster“) bilden, die notwendig sind, um Leukozyten im Blutstrom zu stoppen [Schwarz and Alon, 2004]. Durch die kurzen Wechselwirkungen werden die Zellen in ihrer relativen Geschwindigkeit zur Blutströmung schwach gebremst [Dwir et al., 2003]. Das ebenfalls auf den Monozyten der Patienten mit AE erhöhte CD62P kann dann mit weiteren Liganden interagieren, so dass es zum Rollen der Monozyten auf den Endothelzellen kommt.

Es wird vermutet, dass es durch die Bindung an CD62L zu einer Umordnung des Zytoskelettes kommt. Dadurch können weitere Oberflächenrezeptoren

toren der Monozyten wie die Integrine mit ihren Liganden wechselwirken [Schwarz and Alon, 2004]. Desweiteren wurde beschrieben, dass CD62L direkt die Interaktion zwischen dem Integrin CD49d/CD29 (VLA-4; $\alpha_4\beta_1$) und VCAM-1 fördert und bei einer Blockade von CD62L dieser Weg zur Extravasation unterbrochen wird [Rivera-Nieves et al., 2005]. Da CD62L auf den Monozyten von Patienten mit AE stärker exprimiert wird als von den beiden anderen Kollektiven, könnte dieser Signalweg hier besonders gefördert werden und zu einer besseren Migration aus dem Blutgefäß ins Gewebe führen.

Auf den Mo-LC und Mo-IDEC (zusammengefasst als Mo-DC) wurden die Selektine wesentlich schwächer exprimiert als auf den Monozyten, und auch die prozentualen Anteile Selektin-positiver Mo-DC waren geringer als bei den Monozyten. Es kann daher angenommen werden, dass die Hauptpopulation der unreifen LC und IDEC nicht aus dem Blut ins Gewebe einwandern, da dafür die Selektine benötigt werden. Es wurde bereits beschrieben, dass die Expression von CD62E und CD62L auf Leukozyten in entzündetem Gewebe abnimmt [Kishimoto et al., 1989, Jutila et al., 1989].

Der prozentuale Anteil der CD62P-positiven Mo-LC war bei beiden Patientengruppen schwächer als bei den Zellen der gesunden Spender. Zudem wurde CD62P auf den Mo-LC beider Patientenkollektive schwächer exprimiert als auf den Zellen des gesunden Kollektives (vgl. tabellarische Darstellung im Anhang auf S. XV).

Die Mo-IDEC der Patienten mit Pso exprimierten weniger CD62P und auch die Population der CD62P-positiven Mo-IDEC war schwächer als bei den gesunden Spendern.

Diese schwächere Expression von CD62P auf den Mo-IDEC und Monozyten der Patienten mit Pso und den Mo-LC beider Patientengruppen könnte zu einer schlechteren Interaktion der Zellen mit seinem Liganden, P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSLG-1), führen. Dadurch kann das Rollverhalten der Monozyten von Patienten mit Pso im Blutgefäß gehemmt sein, jedoch auch das Migrationsverhalten der Mo-IDEC und Mo-LC im Gewebe bei beiden Erkrankungen könnte dadurch beeinflusst werden.

Die Daten der Adhäsionsversuche mit laminarer Strömung werden am Ende des Abschnittes zu den Integrinen diskutiert (s. S. 120), da sowohl Selektine

als auch Integrine einen Einfluss auf das Rollen und die Adhäsion der Zellen in laminarer Strömung haben.

6.2.2 Die Integrine

Weitere deutliche Unterschiede wurden für die Expression der Integrine gefunden, wodurch die Fähigkeit, in ein Gewebe einzuwandern und durch das Gewebe zu wandern, beeinflusst wird (vgl. tabellarische Darstellungen im Anhang auf S. XVI ff.).

Eine direkte Aussage über die Expression der Integrin-Heterodimere ist nicht möglich, da in dieser Arbeit nur die Expression der einzelnen α - und β -Ketten untersucht wurde. Dadurch können jedoch die Zellen spezifischer charakterisiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einer starken Expression der einzelnen Ketten eines Heterodimers auch das resultierende Heterodimer exprimiert wird. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Heterodimere mit den in dieser Arbeit untersuchten α - und β -Ketten befindet sich im Anhang auf S. XIV.

Expression der β_2 -Integrine

Durch die hoch signifikant stärkere Expression der β -Kette CD18 der Integrine auf den Monozyten der Patienten mit AE gegenüber den Monozyten der gesunden Spender und die hoch signifikant stärkere Expression der α -Ketten CD11a, CD11b und CD11c auf den Monozyten der Patienten mit AE verglichen mit beiden anderen Kollektiven könnten die Monozyten beim AE besser mit den Liganden dieser Integrine interagieren. Die Liganden sind ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), Fibrinogen sowie der Faktor C3b des Komplementweges. Die bessere Interaktion der β_2 -Integrine mit ihren Liganden könnte die Fähigkeit der Monozyten beim AE, in die Haut einzuwandern, unterstützen. Insbesondere könnte die hoch signifikant stärkere Expression des Integrins CD11a/CD18 (LFA-1) auf den Monozyten beim AE die Fähigkeit, in ein Gewebe einzuwandern, unterstützen (s. Abbildung 6.1(a)). Bei den Monozyten der Patienten mit Pso fällt im Zusammenhang mit den β_2 -Integrinen vor allem die signifikant schwächere Expression der α -Kette CD11b

verglichen mit beiden anderen Kollektiven auf. Das resultierende Integrin CD11b/CD18 (Mac-1, $\beta_2\alpha_M$) könnte demnach schwächer auf den Monozyten bei der Pso exprimiert werden. Eine Konsequenz daraus wäre eine schwächere Interaktion der Monozyten mit VCAM-1.

Es wurde beschrieben, dass Wechselwirkungen mit dem Liganden für CD62P (PSGL-1), der auf den meisten Leukozyten exprimiert wird, die Affinität und Avidität von Leukozyten für ICAM-1 beeinflussen kann [Atarashi et al., 2005]. Zudem ist bekannt, dass die Kreuzvernetzung von CD62L auf Neutrophilen die Adhäsionsfunktion von CD11b/CD18 positiv beeinflusst und die Signale von CD62L die Aktivierung der β_2 -Integrine regulieren [Simon et al., 1995, Hwang et al., 1996, Ding et al., 2003]. Da CD62L auf den Monozyten der Patienten mit AE stärker exprimiert wird, könnte das ebenso einen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Adhäsionsfähigkeit der Monozyten bei der Pso haben.

Bei den Mo-LC und Mo-IDEC sowohl im unstimulierten Zustand als auch im stimulierten Zustand wurden solche hoch signifikanten Unterschiede nicht mehr gefunden. Einzige Ausnahme sind die unstimulierten Mo-IDEC. Bei ihnen war der prozentuale Anteil CD11a-positiver Zellen der Patienten mit AE hoch signifikant geringer gegenüber den Zellen der Patienten mit Pso. Generell ist eine Tendenz zu sehen, nach der CD11a und CD18 auf den Mo-LC und Mo-IDEC der Patienten mit AE geringer exprimiert werden als bei beiden anderen Kollektiven. Auch CD11b wird tendenziell schwächer exprimiert auf den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE als auf den Zellen der Patienten mit Pso. Ebenso wird CD11c tendenziell auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE schwächer exprimiert als auf den Zellen der Patienten mit Pso. Die schwächere Expression der β_2 -Integrine auf den Mo-IDEC und Mo-LC beim AE gegenüber der Pso könnte zu einer schlechteren β_2 -Integrin vermittelten Adhäsion der Mo-DC an den Matrixzellen der Haut führen und damit die Migrationseigenschaft der Mo-DC negativ beeinflussen (s. Abbildung 6.1(a)).

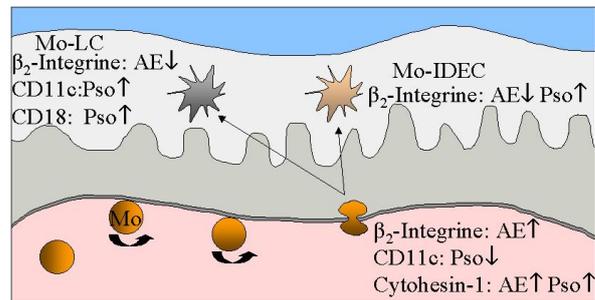
Bei den Mo-DC der Patienten mit Pso fällt die stärkere Expression von CD11c und CD18 auf den Mo-LC und von CD11b auf den Mo-IDEC auf. Das könnte bedeuten, dass die Migration der Zellen in der Haut eher von CD11b/CD18 bei den Mo-IDEC und CD11c/CD18 bei den Mo-LC vermittelt wird. Durch die Bindung der beiden Integrine an ihre Liganden, insbesondere dem Faktor

C3b, mit dem Fremdstoffe opsoniert werden, kann es zu einer verbesserten Allergenaufnahme kommen (s. Abbildung 6.1(a)).

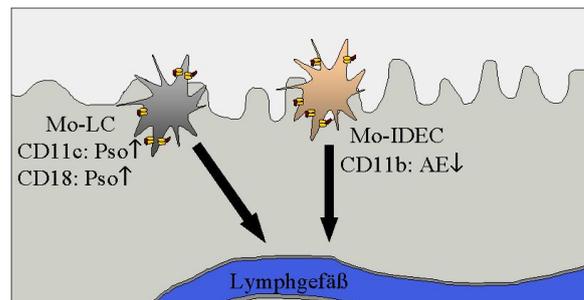
Insgesamt sind die Unterschiede der Expressionsmuster auf den Mo-DC, die durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern bedingt werden, nicht sehr ausgeprägt und werden biologisch eher eine untergeordnete Rolle spielen (s. Abbildung 6.1(b)).

Die Avidität von CD11a/CD18 (LFA-1) hängt auch von der Expression des Cytohesin-1 ab. Cytohesin-1 bindet an die β -Kette CD18 des Integrins und fördert die Signalübertragung sowohl von aussen in die Zelle als auch umgekehrt. Daher könnte die verstärkte Expression von Cytohesin-1 in den Monozyten von Patienten mit AE im Vergleich zu Monozyten der Patienten mit Pso (s. Abbildung 5.37 auf S. 101) zu einer stärkeren Adhäsion an die umgebenden Zellen führen, die den Hauptliganden (ICAM-1) von CD11a/CD18 exprimieren. Dies würde die Migration der Monozyten im Gewebe entlang eines Gradienten aus löslichen Faktoren zum Ort der Entzündung positiv beeinflussen. Auch die tendenziell sehr viel stärkere Expression von Cytohesin-1 in den unstimulierten und stimulierten Mo-DC kann zu einer erhöhten Affinität und Avidität von CD11a/CD18 für seine Liganden führen. Dies könnte die Migrationsfähigkeit positiv beeinflussen, selbst wenn CD11a/CD18 schwächer auf diesen Zellen exprimiert wird als auf den Zellen der gesunden Spender (s. Abbildung 6.1(a)) [Kolanus et al., 1996, Kolanus and Zeitlmann, 1998].

Für einige Erkrankungen wurde beschrieben, dass insbesondere die β_2 -Integrine eine wesentliche Rolle beim Adhären der Monozyten an der Blutgefäßwand und dem anschließenden Einwandern ins Gewebe haben [Watts et al., 2005]. Da die Expression des Cytohesin-1 in den Monozyten der Patienten mit Pso verglichen mit den Monozyten von gesunden Spendern gleich war und die Expression der α -Ketten der β_2 -Integrine auf den Monozyten bei der Pso leicht reduziert war, könnte davon ausgegangen werden, dass neben der Stimulation der β_2 -Integrine noch weitere Signale bei der Pso dazuführen, dass die Monozyten aus dem Blut in die Haut einwandern. Für das Integrin CD11b/CD18 (Mac-1) ist beschrieben worden, dass es auch ein Komplementrezeptor ist [Watts et al., 2005]. Daher kann auch das Komplementsystem eine Rolle bei der Unterhaltung des AE und der Pso spielen, zumal bei der Pso ein Zu-



(a) Einwanderung der Monozyten (Mo) und Wanderung der unstimulierten Mo-DC in der Haut



(b) Wanderung der stimulierten Mo-DC zu den afferenten Lymphgefäßen

Abbildung 6.1: Mögliche Einflüsse der β_2 -Integrin-Expression auf das Rollverhalten und die Einwanderung der Monozyten (Mo) beim AE und bei der Pso verglichen mit den Monozyten der gesunden Spender sowie das Migrationsverhalten der unstimulierten Mo-LC und Mo-IDEC in der Haut (a). Mögliche Einflüsse der β_2 -Integrin-Expression auf das Migrationsverhalten der stimulierten Mo-LC und Mo-IDEC bei der Wanderung zu den afferenten Lymphgefäßen (b). Die Pfeile neben den Rezeptoren geben die Unterschiede der Expression der Integrine an verglichen mit der Expression auf den Zellen der gesunden Spender.

sammenhang zwischen dem Auftreten von Streptokokken-Infektionen und der Erstmanifestation der Pso besteht (s. auch Abschnitt 2.2.2 im Grundlagenteil auf S. 13). Nachdem die Monozyten in die Haut eingewandert sind, hängt ihre weitere Wanderungsfähigkeit verstärkt von den β_1 -Integrinen ab. Daher muss der Befund der verminderten Expression von β_2 -Integrinen auf Mo-IDEC und Mo-LC beim AE keinen Kontrast zur Pathogenese darstellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Monozyten beim AE ins Gewebe migrieren und dort zur Population der unstimulierten IDEC und LC ausdifferenzieren. Nur ein geringer Anteil der IDEC-Population würde demnach aus dem Blut ins

Gewebe migrieren.

Expression der β_1 -Integrine

Bei den Monozyten der Patienten mit AE ist der Anteil CD29-positiver Zellen leicht jedoch signifikant erhöht gewesen. Im Zusammenhang mit der hoch signifikant stärkeren Expression der α -Kette CD49d auf den Monozyten beim AE verglichen mit beiden anderen Kollektiven deutet das auf eine stärkere Expression des Integrins CD49d/CD29 (VLA-4, $\beta_1\alpha_4$). Dadurch könnte vor allem die Interaktion mit den Liganden VCAM-1, welches sowohl auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird als auch auf den Zellen der extrazellulären Matrix, und Fibronectin positiv beeinflusst werden. Da auch die α -Ketten CD49b und CD49e auf den Monozyten der Patienten mit AE stärker exprimiert wurden, könnte die Fähigkeiten zur Migration der Monozyten beim AE aus dem Blutgefäß in die Haut sowie in der extrazellulären Matrix verbessert sein gegenüber dem gesunden Zustand und der Pso (s. Abbildung 6.2(a)).

Auf den Monozyten der Patienten mit Pso wurde vor allem CD49a aber auch CD49c stärker exprimiert verglichen mit beiden anderen Kollektiven. Das könnte bedeuten, dass die Migration der Monozyten bei der Pso stärker durch CD49a/CD29 (VLA-1) und CD49c/CD29 (VLA-3) dominiert wird, während die Migration der Monozyten beim AE eher von CD49b/CD29 (VLA-2), CD49d/CD29 (VLA-4) und CD49e/CD29 (VLA-5) abzuhängen scheint. Die Liganden beider Integrine sind Laminin und Kollagen, die beide in der extrazellulären Matrix vorkommen. Das könnte auch bedeuten, dass die Monozyten bei der Pso eine etwas bessere Fähigkeit zur Migration in der Haut hätten als die Monozyten der gesunden Spender (s. Abbildung 6.2(a)).

CD49d war auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso hoch signifikant stärker exprimiert und auch der prozentuale Anteil CD49d-positiver Zellen war bei den Patienten mit Pso fast doppelt so hoch verglichen mit beiden anderen Kollektiven. Das könnte bedeuten, dass das Integrin CD49d/CD29 auf mehr Mo-IDEC exprimiert wird und auch stärker als bei beiden anderen Kollektiven. Dadurch würde die Migrationsfähigkeit dieser Zellen im Gewebe bei der Pso positiv beeinflusst, da die Liganden des Integrins Fibronectin und VCAM-1 sind (s. Abbildung 6.2(a)).

Die α -Ketten der Integrine CD49a, CD49b und CD49c scheinen auf den Mo-IDEC der drei Kollektive nicht exprimiert zu werden. Die Hauptliganden der Integrin-Heterodimere aus diesen drei α -Ketten mit der β -Kette CD29 sind Laminin und Kollagen. Das könnte bedeuten, dass die Mo-IDEC bei allen drei Kollektiven für die Migration in der Haut auf andere Integrine angewiesen sind. Auch die β -Kette CD104 wurde nicht auf diesen Zellen exprimiert. Ein Hauptligand des Integrins CD104/CD49f ist ebenfalls Laminin. Da die Hauptliganden der anderen Integrine weder Laminin noch Kollagen sind sondern weitere Moleküle wie Fibronectin, ICAM oder VCAM-1, würde das für die Mo-IDEC bedeuten, dass sie schlechter auf Laminin und Kollagen migrieren könnten.

Bei den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE war die β -Kette CD29 schwächer exprimiert als bei den Zellen der gesunden Spender. Außerdem war auch die α -Kette CD49e beim AE schwächer exprimiert als bei der Pso. Das könnte bedeuten, dass das Integrin CD49e/CD29 auf den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE schwächer exprimiert wird, so dass die Interaktion mit dem Hauptliganden des Integrins (Fibronectin) gehemmt sein könnte. Allerdings ist Fibronectin auch der Hauptligand von CD49d/CD29, das auf den stimulierten Mo-IDEC beim AE normal exprimiert wurde (s. Abbildung 6.2(b)).

Der prozentuale Anteil CD49d-positiver unstimulierter Mo-LC war bei beiden Patientengruppen doppelt so hoch wie im gesunden Zustand. Das könnte bedeuten, dass mehr Mo-LC beider Patientengruppen das Integrin CD49d/CD29 exprimieren. Dadurch würde die Anzahl der Zellen gesteigert, die mit Fibronectin und VCAM-1 interagieren können. Das würde die Migrationsfähigkeit der Mo-LC in der Haut bei beiden Erkrankungen positiv beeinflussen (s. Abbildung 6.2(a)).

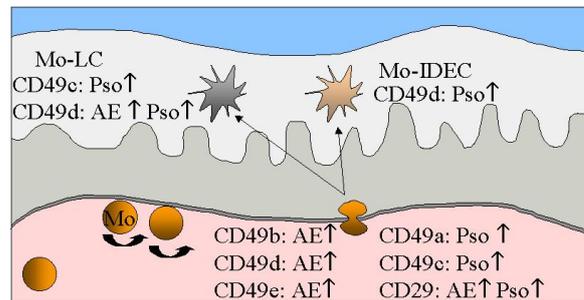
Die Mo-LC haben daher über die Integrine CD49b/CD29 und CD49c/CD29 die Möglichkeit mit Kollagen und Laminin der extrazellulären Matrix zu interagieren. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster der Kollagen- und Laminin-interagierenden Integrine bei den Mo-LC und Mo-IDEC stützt die Hypothese, dass die Mo-IDEC während einer Entzündung in die Haut einwandern, wohingegen die Mo-LC auch im nicht-entzündeten Zustand in der Haut vorhanden

sind. Dabei müssen die Mo-LC auch in einer entzündungsfreien Phase die Möglichkeit besitzen, durch die Haut zu wandern.

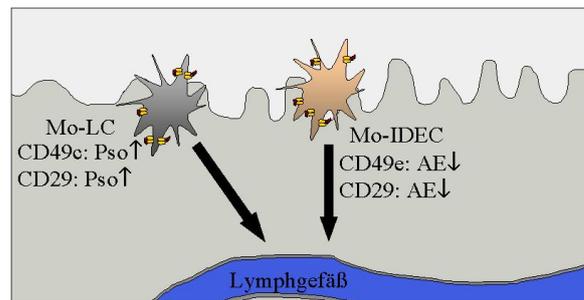
Wahrscheinlich wird die schwächere Expression der α -Kette CD49b auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE gegenüber den Zellen der gesunden Spender nur einen geringen biologischen Einfluss haben, da die Expression von CD49b auf allen drei Kollektiven gering ist. Die schwächere Expression der α -Kette CD49e auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit AE verglichen mit beiden anderen Kollektiven könnte bedeuten, dass das Integrin CD49e/CD29 schwächer exprimiert wird. Das könnte eine verminderte Sensibilität der Zellen für Fibronectin zur Folge haben. Jedoch ist Fibronectin auch von weiteren Integrinen (z. B. CD49d/CD29) ein Hauptligand, die normal oder stärker auf den Mo-LC der Patienten mit AE exprimiert werden.

Auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso werden CD29 und CD49c stärker exprimiert als auf den Zellen der gesunden Spender. Durch die stärkere Expression des CD29 könnten alle β_1 -Integrine stärker auf den stimulierten Mo-LC bei der Pso exprimiert sein und somit die Migrationsfähigkeit in der Haut positiv beeinflussen (s. Abbildung 6.2(b)). Zudem könnte das Heterodimer CD49c/CD29 stärker auf den stimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso exprimiert werden, wodurch die Zellen für die Hauptliganden (Fibronectin, Laminin, Kollagen) des Integrins sensitiver sein könnten.

Sowohl bei den Mo-LC als auch bei den Mo-IDEC schien die Expression von CD29 durch die Stimulation mit IgE abzunehmen. Allerdings sind die Unterschiede der RFI-Werte vor und nach der Stimulation so gering, dass sie wahrscheinlich keine biologische Relevanz haben.



(a) Einwanderung der Monozyten (Mo) und Wanderung der unstimulierten Mo-DC in der Haut



(b) Wanderung der stimulierten Mo-DC zu den afferenten Lymphgefäßen

Abbildung 6.2: Mögliche Einflüsse der β_1 -Integrin-Expression auf das Rollverhalten und die Einwanderung der Monozyten (Mo) beim AE und bei der Pso verglichen mit den Monozyten der gesunden Spender sowie das Migrationsverhalten der unstimulierten Mo-LC und Mo-IDEC in der Haut (a). Mögliche Einflüsse der β_2 -Integrin-Expression auf das Migrationsverhalten der stimulierten Mo-LC und Mo-IDEC bei der Wanderung zu den afferenten Lymphgefäßen (b). Die Pfeile neben den Rezeptoren geben die Unterschiede der Expression der Integrine an verglichen mit der Expression auf den Zellen der gesunden Spender.

Expression der β_3 -Integrine

Der prozentuale Anteil CD41-positiver unstimulierter Mo-IDEC der Patienten mit Pso war hoch signifikant 1,5-fach stärker als bei den Zellen der gesunden Spender. Auch bei den Patienten mit Pso war der prozentuale Anteil CD41-positiver Zellen höher verglichen mit den Zellen des gesunden Kollektives. Das deutet darauf hin, dass das Heterodimer CD41/CD61 bei beiden Patientengruppen von mehr Zellen exprimiert werden würde als im gesunden Zustand. Außerdem war der prozentuale Anteil CD61-positiver unstimulierter Mo-IDEC

der Patienten mit AE höher als bei den Zellen der Patienten mit Pso. Da CD61 auch mit dem in dieser Arbeit nicht untersuchten CD51 ein Heterodimer bilden kann, können die unterschiedlichen prozentualen Anteile CD41-positiver und CD61-positiver Zellen darauf zurückgeführt werden. Durch die stärkere Expression von CD41/CD61 könnten mehr Mo-IDEC mit Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin der extrazellulären Matrix interagieren. Dadurch käme es zu einer besseren Migrationsfähigkeit dieser Zellen beim AE und bei der Pso. Das könnte während eines Schubes des AE zu der verstärkten Präsenz der Mo-IDEC in der entzündeten Haut führen.

Ahäsionsversuche mit laminarer Strömung

Diese unterschiedlichen Expressionsmuster der Integrine und Selektine auf den Mo-LC und Mo-IDEC der Patienten mit AE oder Pso bedingen auch ein unterschiedliches Verhalten bei den Adhäsionsversuchen mit laminarer Strömung. Da die Selektine auf den Mo-DC aller drei Kollektive nur schwach bzw. nicht exprimiert waren und diese Rezeptoren einen wesentlichen Anteil am Übergang der Zelle aus dem laminaren Strom in einen rollenden Zustand auf der Oberfläche der Endothelzellen haben, ist die Anzahl rollender Mo-LC bei diesen Versuchen in den drei Kollektiven annähernd gleich. Bei den Mo-IDEC hingegen ist eine Tendenz zu sehen, nach der die Zellen der Patienten mit AE eher dazu neigen zu rollen als die Zellen der anderen beiden Gruppen (s. Abbildung 5.35(b) auf S. 99). Die Mo-LC der Patienten mit AE neigen eher dazu zu adhären als die Zellen der anderen beiden Gruppen (s. Abbildung 5.35(a) auf S. 99). Dies kann mit der tendenziell gesteigerten Expression des Cytohesin-1 zusammenhängen und der daraus folgenden besseren Affinität und Avidität von CD11a/CD18. Die stärkere Expression von CD49d auf den Mo-LC könnte eine Adhäsion der Zellen an den Endothelzellen ebenfalls fördern, da das Integrin CD49d/CD29 mit VCAM-1 auf den Endothelzellen interagieren kann. Die Mo-IDEC der Patienten mit Pso wiederum scheinen tendenziell besser an den Endothelzellen zu adhären verglichen mit den Zellen der anderen beiden Gruppen. Dieser Effekt könnte mit der gesteigerten Expression von Cytohesin-1 in den Zellen und der gesteigerten Expression einiger α -Ketten der β_2 -Integrine auf den Mo-IDEC zusammenhängen.

6.2.3 Die Tetraspanine

Auch bei den Tetraspaninen gibt es einige unterschiedliche Expressionsmuster auf den Monozyten, Mo-IDEc und Mo-LC zwischen Patienten mit AE, Patienten mit Pso und gesunden Spendern. Eine ausklappbare tabellarische Übersicht über signifikante ($p \leq 0,050$, \uparrow) und hoch signifikante ($p \leq 0,001$, $\uparrow\uparrow$) Unterschiede befindet sich im Anhang auf S. XIX ff..

Tetraspanine sind vor allem an der Signalvermittlung beteiligt, da sie mit verschiedenen Proteinen interagieren können. Durch die Wechselwirkung mit weiteren Tetraspaninen sind sie in der Lage, Ansammlungen („Cluster“) zu bilden, die auch Tetraspanin-Web genannt werden [Boucheix and Rubinstein, 2001, Boucheix et al., 2001]. In diesem Web interagieren Tetraspanine mit weiteren Bindungspartnern (wie den Integrinen) extrazellulär und können zugleich auch mit intrazellulären Proteinen interagieren (s. dazu Abschnitt 2.4.3 im Grundlagenteil auf S. 21).

Expression der Tetraspanine auf den Monozyten

Die Expression der Tetraspanine CD53 und CD63 war auf den Monozyten der Patienten mit AE um etwa ein Drittel stärker als auf den Zellen der Patienten mit Pso und auch signifikant stärker (ebenfalls etwa ein Drittel) als auf den Monozyten der gesunden Spender. Beide Tetraspanine können mit β_2 -Integrinen assoziieren [Skubitz et al., 1996, Shibagaki et al., 1999]. Das könnte zu einer verstärkten Bindungsfähigkeit an die Liganden der β_2 -Integrine führen (s. Abbildung 6.3). Da einige β_2 -Integrine auf den Monozyten der Patienten mit AE ebenfalls hoch signifikant stärker exprimiert werden als auf den Zellen beider anderer Kollektive, könnte die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen der Blutgefäße stark positiv beeinflusst sein. Dadurch wäre die Extravasation der Monozyten ins Gewebe beim AE unterstützt. Zudem wurde für die Interaktion von CD63 mit CD11b/CD18 (Mac-1) auch eine gesteigerte Tyrosinkinase Aktivität (Lyn und Hck) dokumentiert, was die Migration der Zellen zusätzlich unterstützt [Skubitz et al., 1996].

Für CD53 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass seine Kreuzvernetzung zu einer Aktivierung von B-Zellen und Monozyten führt [Olweus et al., 1993]. Auch

konnte in der publizierten Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung PKC unabhängig ist, sondern von Zelltyp-spezifischen Tyrosin-Kinasen vermittelt wird. Da CD53 verstärkt auf den Monozyten von Patienten mit AE exprimiert wurde, könnte das eine verstärkte Aktivierung der Monozyten beim AE zur Folge haben (s. Abbildung 6.3).

In einem Modell mit Mastzellen von Ratten konnte gezeigt werden, dass die Blockade von CD63 durch einen Antikörper zu einer Reduktion der Adhäsion der Mastzellen an den Zellen der extrazellulären Matrix führt und es zu einer Unterdrückung einer IgE-vermittelten Degranulation kommt [Kraft et al., 2005]. CD63 kann auch auf anderen Zellen mit den Integrinen CD49c/CD29, CD49d/CD29 und CD49f/CD29 interagieren und dabei die Adhäsion der Zelle an die extrazellulären Liganden der Integrine verstärken [Berditshevski et al., 1995, Mannion et al., 1996, Radford et al., 1997]. Das könnte auch bei der Pso und dem AE einen Einfluss auf die Adhäsion und Migration der Monozyten haben, da bei beiden Erkrankungen die Expression von CD63 gut ein Drittel stärker war verglichen mit den gesunden Spendern (s. Abbildung 6.3).

Für die Monozyten der Patienten mit AE war zusätzlich eine Tendenz zu sehen, nach der der prozentuale Anteil CD9-positiver und CD151-positiver Zellen erhöht war verglichen mit beiden anderen Kollektiven. Die Expression von CD9 war auf den Monozyten der Patienten mit Pso etwa ein Drittel stärker als im gesunden Zustand. CD9 kann wie auch CD81 mit CD49c/CD29 interagieren [Stipp et al., 2003]. Dadurch könnte die Zellbeweglichkeit auf Laminin positiv beeinflusst werden (s. Abbildung 6.3). Die schwächere Expression von CD81 auf den Monozyten beider Patientengruppen muß nicht zwangsläufig einen negativen Effekt auf diese Interaktion mit Laminin haben, da angenommen wird, dass die Funktionen von CD9 und CD81 in dieser Hinsicht redundant sind [Stipp et al., 2003]. CD151 bildet Komplexe mit den α -Ketten CD49c und CD49f der Integrine. Der Komplex aus CD151 und CD49f/CD29 reguliert die Zellmorphologie und die Adhäsionsstärke an Laminin [Kazarov et al., 2002, Zhang et al., 2002, Lammerding et al., 2003]. Hierdurch könnte insgesamt die Migrationsfähigkeit insbesondere der Monozyten von Patienten mit AE gegenüber den Zellen der gesunden Probanden jedoch auch der Patienten mit

Pso verbessert sein.

Desweiteren können CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 und CD82 mit den Rezeptoren der MHC-Klasse II assoziiert sein (s. Abbildung 6.3) [Levy and Shoham, 2005]. Darauf wird im Abschnitt zur Expression der MHC-Moleküle auf den Monozyten ab S. 129 weiter eingegangen. Es wird vermutet, dass durch die Tetraspanine die Entwicklung einer T_H1 - bzw. T_H2 -Antwort beeinflusst wird [Levy and Shoham, 2005].

Für die Tetraspanine CD9, CD63 und CD151 werden einige Interaktionen mit Fc-Rezeptoren in der Literatur diskutiert [Kaji et al., 2001, Wright et al., 2004, Moseley, 2005, Kraft et al., 2005]. Da auf die Expression der Fc-Rezeptoren ab S. 128 näher eingegangen wird, werden die Interaktionen der Tetraspanine mit den Fc-Rezeptoren auch an dieser Stelle näher diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass die stärkere Expression der drei Tetraspanine auf die Signaltransduktion der Fc-Rezeptoren für IgE und IgG einen positiven Einfluss haben [Moseley, 2005]. Das könnte insbesondere bei den Monozyten der Patienten mit AE einen biologisch relevanten Effekt haben, da die drei Tetraspanine auf diesen Zellen stärker exprimiert wurden verglichen mit beiden anderen Kollektiven (s. Abbildung 6.3).

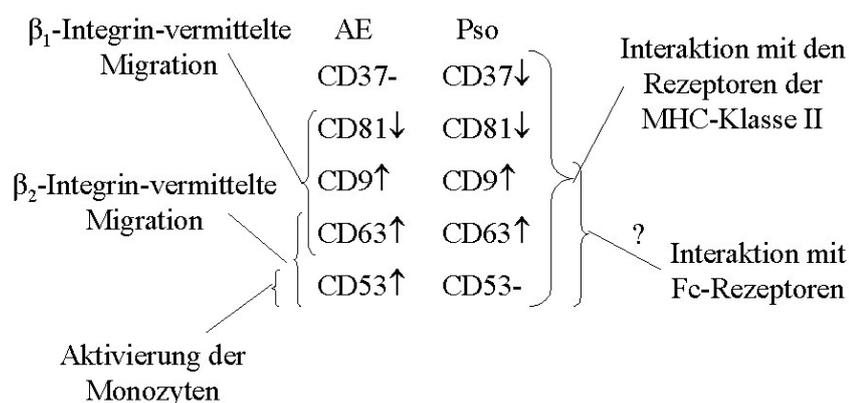


Abbildung 6.3: Mögliche Einflüsse der Expression der Tetraspanine auf den Monozyten beim AE und bei der Pso auf weitere Zellsignalwege. Die Pfeile neben den Rezeptoren geben die Unterschiede der Expression der Integrine an verglichen mit der Expression auf den Zellen der gesunden Spender.

In einer früheren Arbeit wurde das zytoplasmatische Vorkommen sowie die Oberflächenexpression von der selben Gruppe der Tetraspanine (CD9, CD53,

CD63, CD81, CD82 und CD151) mit Ausnahme von CD37 bei Monozyten, aber auch bei T- und B-Zellen sowie von einkernigen Zellen (PBMC) des peripheren Blutes im Allgemeinen beschrieben [Tohami et al., 2004]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werte für das Expressionmuster der Tetraspanine stimmen gut mit dem dort beschriebenen Muster überein. Auch wurden in der Arbeit von Tohami und seinen Kollegen, Monozyten von Patienten mit einer Pneumonie oder einer Infektion der Harnwege im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden im Hinblick auf die Expression von CD53, CD63, CD81 und CD82 untersucht. Von ihnen wurde gezeigt, dass es durch die Entzündung zu einer verringerten Expression von CD82 kommt, während für CD53, CD63 und CD81 keine Unterschiede in der Expression festgestellt wurden. Das die Unterschiede, die in der vorliegenden Arbeit für die Expression der Tetraspanine gefunden wurden, nicht mit den dort publizierten Daten übereinstimmen, kann an der geringen Stichprobe der untersuchten Blutproben von Patienten liegen, die in der Arbeit von Tohami und seinen Kollegen verwendet wurden und den verschiedenen Pathomechanismen zwischen einer Pneumonie bzw. einer Infektion der Harnwege und dem AE bzw. der Pso.

Expression der Tetraspanine auf den Mo-DC

Die Wechselwirkungen der Tetraspanine CD151, CD81 sowie CD9 mit Integrinen (vor allem CD49f/CD29 und CD49c/CD29) können die Migration der Mo-IDEC durch das Gewebe positiv beeinflussen [Lammerding et al., 2003, Stipp et al., 2003]. Das könnte insbesondere beim AE eine wichtige Rolle für die Zellebeweglichkeit unstimulierter und stimulierter Mo-IDEC in der Haut haben, da CD151 auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE doppelt so stark exprimiert wurde verglichen mit den gesunden Spendern. Ebenso wurde CD81 wesentlich stärker auf den unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC dieser Patienten exprimiert gegenüber den Zellen der gesunden Spender. Auf den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso wurde CD81 doppelt so stark exprimiert verglichen mit dem gesunden Kollektiv, wodurch die oben beschriebenen Effekte auch bei der Pso eine Rolle spielen könnten. Dazu könnte die stärkere Expression von CD9 auf den unstimulierten Mo-IDEC, sowie von CD151 auf den unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC und von CD81

auf den stimulierten Mo-IDEC dieser Patientengruppe im Vergleich zu den Zellen der gesunden Spender beitragen (s. Abbildung 6.4(b)).

Auf den Mo-LC wurde von den drei Tetraspaninen (CD9, CD81 und CD151) nur CD81 auf den stimulierten Zellen bei Patienten mit AE fast doppelt so stark exprimiert verglichen mit dem gesunden Kollektiv, während der prozentuale Anteil CD151-positiver unstimulierter Mo-LC der Patienten mit Pso tendenziell geringer war verglichen mit den Zellen der gesunden Spender. Daher könnte angenommen werden, dass die Migrationsfähigkeit der Mo-LC beider Patientengruppen nicht von den Tetraspaninen beeinflusst wird.

Die verstärkte Expression von CD81 auf den unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC bei beiden Patientenkollektiven kann zusätzlich zu einer Verstärkung der Signale für den ERK/MAPK-Übertragungsweg führen (s. Abbildung 6.4(b)) [Carloni et al., 2004]. Zudem kann die verstärkte Expression von CD81 auch indirekt die Affinität von CD11a/CD18 beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass CD81 involviert ist in die Aktivierung von Typ II PI4K [Carloni et al., 2004]. Das ist auch die Verbindung zum ERK/MAPK-Signalweg. PI4K können Cytohesin-1 phosphorylieren, so dass es zur Zellmembran transportiert wird. Dort bindet Cytohesin-1 nichtkovalent an CD11a/CD18, wobei es die Avidität und Affinität des Integrins CD11a/CD18 beeinflusst. Daraus könnte gefolgert werden, dass die unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC beider Patientengruppen eine verbesserte Signalweiterleitung besäßen als im gesunden Zustand. Das könnte den Pathomechanismus beider Erkrankungen unterstützen.

Sowohl bei den Mo-LC als auch bei den Mo-IDEC wurde eine Abnahme der Expression von CD81 durch die Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern beobachtet, wobei jedoch nur für die Zellen der Patienten mit Pso ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Da die Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Mo-DC in allen drei Kollektiven ein ähnliches proportionales Verhältnis aufweisen, könnte das bedeuten, dass die signalverstärkende Wirkung des CD81 auf den stimulierten Mo-DC reduziert ist. Ein ähnlicher Effekt wurde für die Expression von CD151 auf den Mo-LC festgestellt, wobei nur bei den Mo-LC der Patienten mit AE keine signifikante Reduktion der CD151-Expression festgestellt werden konnte (vgl. Abbildung

5.29 auf S. 91). Ebenfalls war die Expression von CD9 nach einer Stimulation mit IgE bei Mo-LC der Patienten mit Pso reduziert. Das könnte insgesamt zu einer schlechteren Migrationsfähigkeit der stimulierten Mo-LC bei der Pso gegenüber den unstimulierten Mo-LC führen.

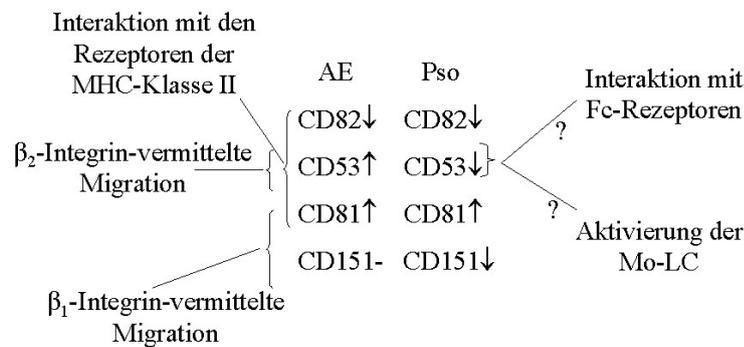
CD53 und CD63 interagieren mit den β_2 -Integrinen [Kropshofer et al., 2002, Mantegazza et al., 2004, Skubitz et al., 1996, Shibagaki et al., 1999]. Die verstärkte Expression dieser zwei Tetraspanine von unstimulierten Mo-IDEC bei Patienten mit AE gegenüber beiden anderen Kollektiven und die verstärkte Expression von CD53 auf den stimulierten Mo-IDEC und Mo-LC beim AE verglichen mit dem gesunden Kollektiv sowie CD63 auf den stimulierten Mo-LC beim AE verglichen mit der Pso würde die Fähigkeit dieser Zellen zur Migration durch die Bildung von Komplexen mit den β_2 -Integrinen begünstigen (s. Abbildung 6.4). Hierdurch könnte die schwächere Adhäsion der Mo-IDEC beim AE, die durch die schwächere Expression der β_2 -Integrine bedingt sein kann, kompensiert werden. Der stärkere prozentuale Anteil CD53-positiver stimulierter Mo-IDEC der Patienten mit Pso könnte auch bei der Pso zu einer verbesserten β_2 -Integrin-vermittelten Migration führen. Umgekehrt könnte die schwächere Expression von CD53 auf den unstimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso eben diese β_2 -Integrin-vermittelte Migration hemmen.

Es ist nicht auszuschließen, dass eine Kreuzvernetzung von CD53 bei den Mo-LC und Mo-IDEC ebenfalls zu einer Aktivierung führen kann, wie es für die Monozyten beschrieben wurde (s. Abbildung 6.4) [Olweus et al., 1993]. Dadurch könnten Signale in den unstimulierten Mo-IDEC der Patienten mit AE sowie in den stimulierten Mo-LC beim AE und den stimulierten Mo-IDEC der Patienten mit Pso positiv beeinflusst werden.

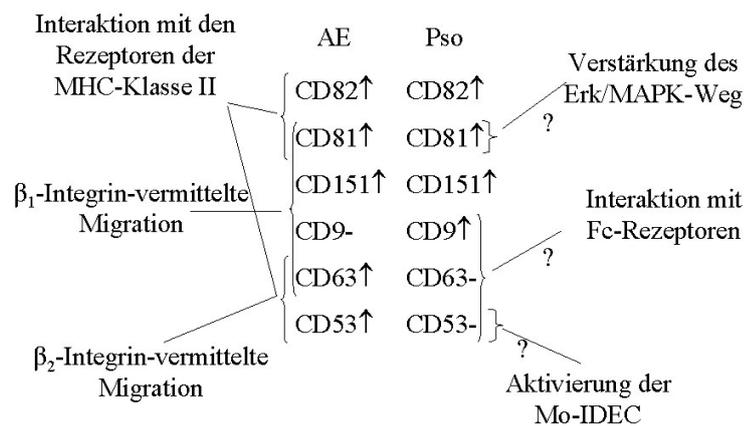
Durch die Bildung von Komplexen aus CD63 und CD49c/CD29, CD49d/CD29 oder CD49f/CD29, kann die Adhäsion und Migration von Zellen positiv beeinflusst werden [Berditchevski et al., 1995, Mannion et al., 1996]. Für die unstimulierten Mo-IDEC und die stimulierten Mo-LC der Patienten mit Pso wurde eine etwas stärkere Expression von CD63 gefunden. Da die oben erwähnten Integrine auf den Mo-IDEC und Mo-LC der Patienten mit AE nicht erhöht exprimiert waren im Vergleich zu Mo-IDEC der anderen beiden Kollektive, könnte die erhöhte Expression von CD63 beim AE im Vergleich zur Pso zu

einer besseren Migration der Zellen im Gewebe beim AE führen (s. Abbildung 6.4).

CD53, CD63, CD81 und CD82 sind auch mit den Rezeptoren der MHC-Klasse II assoziiert [Levy and Shoham, 2005, Escola et al., 1998, Angelisova et al., 1994] und für CD53 und CD82 sind ebenfalls Wechselwirkungen mit den Rezeptoren der MHC-Klasse I bekannt [Szollosi et al., 1996, Lagaudriere-Gesbert et al., 1997]. Die stärkere Expression der vier Tetraspanine (CD53, CD63, CD81 und CD82) auf den Mo-IDEC und stimulierten Mo-LC beider Patientengruppen könnte zu einer verbesserten Stimulation der T-Zellen durch diese Zellen führen (s. Abbildung 6.4).



(a) Mögliche Einflüsse auf den Mo-LC



(b) Mögliche Einflüsse auf den Mo-IDEC

Abbildung 6.4: Mögliche Einflüsse der Expression der Tetraspanine auf den Mo-LC (a) und Mo-IDEC (b) beim AE und bei der Pso auf weitere Zellsignalwege. Die Pfeile neben den Rezeptoren geben die Unterschiede der Expression der Integrine an verglichen mit der Expression auf den Zellen der gesunden Spender.

6.2.4 Expression der Fc-Rezeptoren für IgE und IgG auf Monozyten

Für einige Fc-Rezeptoren wurden Komplexe mit verschiedenen Tetraspaninen beschrieben, wodurch die Tetraspanine zu einer Aktivierung der Zelle beitragen können [Wright et al., 2004, Moseley, 2005]. Jedoch wird angenommen, dass die Wechselwirkungen zwischen Tetraspaninen und Fc-Rezeptoren nur sekundärer oder tertiärer Art sind und nur temporär auftreten [Moseley, 2005]. Dennoch haben Tetraspanine in diesen Komplexen eine signalverstärkende Funktion.

Die verstärkte Expression von FcεRI und FcεRII/CD23 auf Monozyten bei Patienten mit AE wurde schon früher beschrieben [Novak et al., 2001a]. Die verstärkte Expression des FcεRI auf den Monozyten der Patienten mit Pso ist ein Epiphänomen des Atopikers unter den Patienten mit Pso (vgl. tabellarische Übersicht im Anhang auf S. XX). Durch die Expression des FcεRI kann die Fähigkeit der Monozyten bei beiden Erkrankungen, ein IgE-gebundenes Antigen / Allergen zu erkennen und zu phagozytieren, verstärkt werden. Da bei der Pso des Typ I ein erhöhter IgE-Spiegel im Serum nachweisbar ist, könnte die Expression des FcεRI einen Einfluss auf den Pathomechanismus haben.

Für CD63 der Zellen von Ratten und FcεRI sowie für humanes CD9 und FcεRI wurden Komplexe in der Ratten Zelllinie RBL-2H3 beschrieben [Kitani et al., 1991, Higginbottom et al., 2000]. Jedoch ist noch nicht geklärt, wodurch die signalverstärkende Funktion der Tetraspanine hervorgerufen wird. Es kann zu einer indirekten Signalverstärkung kommen, wie für CD63 gezeigt wurde, in dem durch Tetraspanine intrazelluläre Proteine wie PI4K oder Isozyme der PKC aktiviert werden [Kraft et al., 2005]. Dadurch können verschiedene Signalwege aktiviert werden, die auch Signale des FcεRI oder FcεRII/CD23 verstärken. Durch diese stärkere Expression der Fc-Rezeptoren für IgE auf Monozyten von beiden Patientengruppen, so wie der ebenfalls stärkeren Expression der Tetraspanine CD9 und CD63 bei beiden Patientengruppen könnten die Monozyten besser in der Lage sein, IgE-gebundene Antigene zu phagozytieren und zu prozessieren.

6.2.5 Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Rezeptoren auf Monozyten

Die stärkere Expression der Rezeptoren der MHC-Klasse I bei der Pso steht im Einklang mit dem Pathomechanismus der Pso. CD8-positive T-Zellen werden durch Rezeptoren der MHC-Klasse I aktiviert. Diese T-Zellen befinden sich schon zu einem frühen Zeitpunkt verstärkt in der marginalen Zone der psoriatischen Entzündung zusammen mit CD45RO⁺ Gedächtniszellen [Visser et al., 2004].

Der hoch signifikante Unterschied der stärkere Expression von CD74 auf den Monozyten der Patienten mit Pso im Vergleich zu den Monozyten gesunder Spender kann zu einer stärkeren Antigenprozessierung führen. Dadurch würde die Immunantwort bei der Pso gegenüber den gesunden Spendern verstärkt.

Tetraspanine können ebenfalls eine kostimulierende Funktion übernehmen, wobei es zumeist weiterer Rezeptoren in diesem Komplex mit Tetraspaninen bedarf. Nur für CD82 konnte bislang nachgewiesen werden, dass es direkt ein kostimulierendes Signal an die T-Zelle geben kann [Levy and Shoham, 2005]. Die stärkere Expression von CD74 und CD86 auf Monozyten von Patienten mit Pso zusammen mit der stärkeren Expression von CD63 auf diesen Zellen könnte einen Hinweis darstellen, dass diese Rezeptoren auf der Membran der Monozyten bei der Pso verstärkt Komplexe bilden können [Mantegazza et al., 2004]. Das könnte bei der kostimulierenden Funktion des CD86 zu einer Verstärkung des Signals an die T-Zelle führen.

Bei unreifen dendritischen Zellen sind die meisten MHC-Klasse II Rezeptoren in MHC-Klasse II-Rezeptor angereicherten Kompartimenten vorhanden, den so genannten MIIC. Hier findet auch die Peptidbeladung der Rezeptoren der MHC-Klasse II statt. CD9, CD37, CD53, CD63 und CD81, die alle auf den Monozyten der beiden Patientengruppen stärker exprimiert werden, sind zusammen mit Rezeptoren der MHC-Klasse II und kostimulatorischen Rezeptoren in den internen Vesikeln des MIIC nachgewiesen worden, die auch Exosome genannt werden [Escola et al., 1998, Van Niel et al., 2003, Levy and Shoham, 2005]. Es wird angenommen, dass die Tetraspanine in diesem Komplex der Stabilisierung und dem korrekten Zusammenbau der

Rezeptoren der MHC-Klasse II dienen. Auch werden die PI4K, die an die Tetraspanine binden, für den Transport der Vesikel vom Golgi zur Membran benötigt [Wright et al., 2004]. Für CD53 und CD82 sind auch Interaktionen mit den Rezeptoren der MHC-Klasse I bekannt [Szollosi et al., 1996, Lagaudriere-Gesbert et al., 1997].

Es konnte nachgewiesen werden, dass einige Mikroansammlungen aus Rezeptoren der MHC-Klasse II und Tetraspaninen zwischen der Plasmamembran und den endosomalen-lysosomalen Peptid-beladenen Kompartimenten im Zytoplasma pendeln [Kropshofer et al., 2002]. Bisher ist noch nicht geklärt, ob die Assoziation der Tetraspanine mit den Rezeptoren der MHC-Klasse I und -Klasse II spezifisch sind oder redundant [Levy and Shoham, 2005]. Jedoch wird vermutet, dass die Rezeptoren der MHC-Klasse II, die in Lipid Rafts vorhanden sind, T-Zellen auf eine andere Weise stimulieren als Rezeptoren der MHC-Klasse II, die in einer Ansammlung aus Tetraspaninen vorhanden sind. Das wird als möglicher Grund betrachtet für den Erhalt einer T_H1 - bzw. T_H2 -Antwort nach der Stimulation von naiven T-Zellen durch APC [Kropshofer et al., 2002].

6.3 Ausblick

Für die Monozyten wurden die meisten und stärksten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen und den Zellen der gesunden Spender gefunden. Durch die stärkere Expression von CD62L sowie der Integrine könnten die Monozyten beider Patientengruppen leichter aus dem Blutgefäß in die Haut einwandern. Durch die Expression des $Fc\epsilon RI$ auf den Monozyten beider Patientengruppen kann die Phagozytose eines Antigens / Allergens positiv beeinflusst werden. Schließlich scheinen einige Rezeptoren des MHC auf den Monozyten beider Patientengruppen stärker exprimiert zu werden, wodurch die Antigenpräsentation unterstützt würde. All das könnte durch die stärkere Expression der meisten untersuchten Tetraspanine zusätzlich unterstützt werden.

Die unstimulierten Mo-IDEC beider Erkrankungen zeigen ein Expressionsmuster der Oberflächenrezeptoren, dass auf eine verbesserte Fähigkeit zum Rollen, zur Adhäsion und Migration und zu einer verbesserten Signalüber-

tragung führt im Vergleich zu den Mo-IDEC der gesunden Spender. Durch die stärkere Expression von CD151 auf den Mo-IDEC beider Patientengruppen könnten zudem auch die Signale der $Fc\gamma$ -Rezeptoren verstärkt werden [Tarrant et al., 2003]. Bei den Mo-IDEC der Patienten mit AE ist durch die verstärkte Expression von CD53 und CD63 eine zusätzliche Verstärkung der Signale des $Fc\epsilon$ RI möglich. Die Mo-IDEC der Patienten mit Pso zeigten eine stärkere Expression von CD37, CD81 und CD82. Diese Tetraspanine können für eine korrekte Zusammensetzung der Rezeptoren der MHC-Klasse I und -Klasse II wichtig sein.

Die wenigsten und schwächsten Unterschiede wurden bei den Mo-LC der drei Kollektive erhalten. Die Integrine sind eher schwächer auf den unstimulierten Mo-LC beider Patientengruppen exprimiert, wie auch die Tetraspanine. Das könnte bedeuten, dass die unstimulierten Mo-LC bei beiden Erkrankungen ähnlich der Mo-LC im gesunden Zustand migrieren oder gar schlechter migrieren würden. Bei den stimulierten Mo-LC ändert sich dieser Zustand leicht, dennoch scheinen die stimulierten Mo-LC beider Patientengruppen keine wesentlich verbesserte Migrationsfähigkeit zu besitzen.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die LC der Haut zwar eine wichtige Funktion bei der Antigenerkennung und Antigenpräsentation haben, aber die akute Präsentation im Lymphknoten nach dem Eindringen eines Antigens durch eine andere dermale DC-Subpopulation erfolgt [Kissenpfennig et al., 2005]. Das Einwandern dermalen DC-Populationen in den kutanen Lymphknoten nach einer Kontakthypersensibilisierung wurde mit Hilfe eines Mausmodells untersucht. Dabei stellten Kissenpfennig und seine Kollegen fest, dass für die Aktivierung der T-Zellen die LC der Haut nicht nötig waren, während eine weitere nicht näher charakterisierte dermale DC-Population essentiell war. Im Kontext der vorliegenden Arbeit bedeutet das, die LC müssten beim AE nicht die gedachte primärauslösende Funktion haben. Da sie permanent in der Haut vorkommen, wird angenommen, dass sie auch als erste das Allergen beim AE aufnehmen und dann in den Lymphknoten wandern. Nach dieser gerade veröffentlichten Arbeit würde es bedeuten, dass eine weitere dermale DC-Population, die eventuell auch zu der IDEC-Population reifen kann, den Pathomechanismus der AE

voran treiben könnte. Monozyten würden in die Haut einwandern und zu IDEC differenzieren. Diese IDEC würden wie die LC das Allergen aufnehmen und in den Lymphknoten wandern. Dort würden sie das Allergen präsentieren und den Entzündungsprozess in Gang bringen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unstimulierten Mo-IDEC tatsächlich durch die gesteigerte Expression der Integrine und Tetraspanine bei beiden Erkrankungen leichter aktivierbar sein können als die Mo-LC. Aus diesem veränderten Expressionsmuster bei beiden Erkrankungen könnte ebenfalls eine bessere migratorische Fähigkeit der Mo-IDEC folgen. Daher wäre es interessant die Migrationsgeschwindigkeiten von IDEC-Populationen mit denen von LC-Populationen zu vergleichen, wobei beide DC-Subtypen direkt aus der Haut isoliert sein sollten.

Es wurde berichtet, dass es zu einer Adhäsion der Monozyten an den Epithelzellen kommen kann, ohne dass Selektine dabei mitwirken [Peterson et al., 2005]. Dieser Sachverhalt könnte durch eine Blockade der Selektine in den Adhäsionsversuchen unter Strömungsbedingungen untersucht werden. Daraus könnten Erkenntnisse erhalten werden, ob die Selektine für die Wanderung von Monozyten beider Erkrankungen aus dem Blutgefäß in die Haut redundant sind.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Affinität und Avidität von CD11a/CD18 von der Konformation des Integrins sowie Chemokinen, die Endothel gebunden und nicht gelöst vorliegen, bestimmt wird. Demnach würde die CD11a/CD18-vermittelte Adhäsion der Zellen nicht durch die Umordnung und Bildung von Mikroansammlungen der Integrine hervorgerufen, sondern in kürzester Zeit (innerhalb einer Sekunde) durch die Wechselwirkung von CD11a/CD18 auf den Leukozyten mit ICAM-1 auf den Endothelzellen [Shamri et al., 2005]. Wichtig ist die vorherige „Aktivierung“ von CD11a/CD18, so dass das Integrin in einen hochaffinen Zustand übergeht, bei dem es etwa 25 nm aus der Zelloberfläche herausragt. Im gefalteten, niedrigaffinen Zustand ragt es nur etwa 5 nm aus der Zelloberfläche herausragt. Eine Umordnung des Zytoskelettes wäre nicht nötig. Interessant ist es in dem Zusammenhang zu untersuchen, inwieweit Cytohesin-1 die Konformation von CD11a/CD18 beeinflussen kann in einer Art „inside-out“ Signalübertragung.

Die schwächere Expression von CD82 auf den unstimulierten Mo-LC bei beiden Patientenkollektiven und die stärkere Expression von CD82 auf den unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC scheinen ein bisher nicht beschriebenes Charakteristikum der Erkrankungen darzustellen. Dies sollte weiter untersucht werden, vor allem in Hinblick auf die postulierte Beeinflussung der Zellsterblichkeit sowie die Beeinträchtigung der korrekten Zusammensetzung der Rezeptoren der MHC-Klasse I und -Klasse II [He et al., 2004, Levy and Shoham, 2005]. Da bei den unstimulierten Mo-LC beider Patientengruppen der prozentuale Anteil CD82-positiver Zellen nur halb so stark war verglichen mit den gesunden Spendern, könnte dies die Zellsterblichkeit der Mo-LC erhöhen [He et al., 2004]. Das würde die These stützen, dass bei beiden Erkrankungen weitere Subpopulationen der DC wie z. B. die IDEC eine wichtige Rolle beim chronischen Verlauf haben. Denkbar wäre auch, dass sowohl die Rezeptoren der MHC-Klasse I als auch der MHC-Klasse II bei der Pso eine veränderte Zusammensetzung der assoziierten Moleküle besitzen könnten, und dass ein Auslöser für die Erkrankung sein könnte.

Für weitere Erkenntnisse beim AE sollte geklärt werden, inwieweit CD9 und CD63 auf den Monozyten aber auch auf den dendritischen Zellen tatsächlich mit $Fc\epsilon RI$ interagieren und welche weiteren Proteine daran beteiligt sein könnten [Levy and Shoham, 2005, Kraft et al., 2005]. Dabei könnten neue Aspekte zur potenziellen Aktivierbarkeit erhalten werden. In einer Arbeit von Kraft und seinen Kollegen wurde an Mastzellen aus Ratten gezeigt, dass die Blockade von CD63 zu einer Unterbrechung des Gab2-PI3K-PKC δ -Weges führt, der die Signale des kreuzvernetzten hochaffinen IgE-Rezeptors $Fc\epsilon RI$ verstärkt. Es wäre denkbar, dass die stärkere Expression von CD63 auf Monozyten von Patienten mit AE zu einer ähnlichen Verstärkung des Signals durch eine Kreuzvernetzung des $Fc\epsilon RI$ führen könnte. Für die AE wird angenommen, dass die Expression des $Fc\epsilon RI$ auf der Oberfläche der Monozyten und der dendritischen Zellen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese hat (s. Grundlagenteil auf S. 9 ff.).

Es ist gut untersucht, dass die Wanderung von Zellen mit der Chemokinvermittelten Aktivierung von PI3K zusammenhängt [Curnock et al., 2002]. Die weiterführenden Signalwege in der Zelle sind noch nicht im Ganzen geklärt

und verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die IL-8-vermittelte Actin-Umordnung, Adhäsion und *in vitro* Wanderung von Neutrophilen, sowie die SDF-1-vermittelte Aktivierung, Wanderung und Proliferation von humanen CD34⁺ Vorläuferzellen wesentlich von der Aktivierung von Protein Kinase C- ζ (PKC- ζ) abhängt [Laudanna et al., 1998, Petit et al., 2005]. Auch konnte gezeigt werden, dass PKC- ζ bei der sekundär lymphoiden Chemokin (SLC)-vermittelten Bildung von CD11a/CD18-Ansammlungen und anschließenden Adhäsion der T-Zellen an ICAM-1 eine wesentliche Rolle spielt [Giagulli et al., 2004]. In diesem Zusammenhang bleibt zu klären, inwieweit PKC- ζ in den Monozyten und DC-Subtypen bei der Pso und dem AE überexprimiert wird. Desweiteren bleibt zu klären, ob PKC- ζ in der Lage ist, Cytohesin-1 zu aktivieren und damit die migratorischen Fähigkeiten der Zellen zu beeinflussen.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass die Kreuzvernetzung von CD11b/CD18 bei Neutrophilen zu einer Aktivierung dieser Zellen und einer Oberflächenexpression von CD80, CD86 sowie den Rezeptoren der MHC-Klasse II (hier nur HLA-DR) führt [Sandilands et al., 2005]. Dies würde die Zellen dazu befähigen, ebenfalls Antigene zu präsentieren, da sie wie auch Monozyten und Makrophagen zur Phagozytose von Antigenen / Allergenen in der Lage sind. Es wurde noch nicht berichtet, ob dies auch *in vivo* nachzuweisen ist. Wenn dieser Umstand jedoch nachweisbar ist, könnten Neutrophile eine wichtige Rolle beim chronischen Verlauf des AE und insbesondere der Pso spielen, da sie ins entzündliche Gewebe einwandern und dort T-Zellen durch die Präsentation von Antigenen aktivieren könnten.

Die Monozyten wären auch bei beiden Erkrankungen ein gutes Ziel für eine Therapie. Das hätte den Vorteil, dass die Therapie vorbeugend eingesetzt werden könnte und nicht nur die Symptome behandelt werden würden. Ein auf den ersten Blick lohnendes Ziel wären die Tetraspanine. Sie wurden auf den Monozyten und auch auf den Mo-IDEC beider Patientengruppen stärker exprimiert als auf den Zellen gesunder Spender. Jedoch ist die Funktion der meisten Tetraspanine redundant, so dass gleich mehrere Tetraspanine spezifisch in ihrer Funktion blockiert werden müssten. Außerdem werden viele der untersuchten Tetraspanine auf verschiedenen Zelltypen exprimiert und nicht

nur auf den immunkompetenten Zellen. Das könnte zu verschiedensten unerwünschten Nebenwirkungen führen.

Interessant im Zusammenhang mit den Selektinen ist die Entwicklung von Polyethylenoxid-Polymeren, die an ihren Enden vier oder zwölf Sialyl-Lewis x-mimetische sulfatisierte Oligosaccharide besitzen [Rele et al., 2005]. Selektine sind vor allem bei der Pso bereits als Ziel einer medikamentösen Behandlung ausgesucht worden. Aufgrund des Dendrimercharakters sind die Polyethylenoxid-Polymere biologisch stabiler als bisher verwendete lineare Verbindungen. Die linearen Verbindungen zeigen nur eine geringe Affinität zu den Selektinen und werden schnell enzymatisch abgebaut und / oder sind potenziell immunogen. Die neuen polymeren Verbindungen hemmen akute Entzündungen in einem Mausmodell. Dabei nimmt der entzündungshemmende Effekt mit der Anzahl der Oligosaccharid-Einheiten je Polymermolekül zu. Mit diesen Verbindungen könnte es möglich sein, die Anzahl rollender Monozyten vor allem bei Patienten mit AE aber auch bei Patienten mit Pso zu verringern.

Ebenso könnten auch immunmodulatorische Medikamente (wie FK506/Tacrolimus oder Pimecrolimus) einen Einfluß auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren haben. Dadurch könnte das Einwandern der Monozyten in die Haut geschwächt werden [Novak et al., 2005]. Auf welche Expression der Integrine und Selektine solche Medikamente einwirken, sollte näher untersucht werden.

Mit Hilfe von TNF- α aktivierten humanen vaskulären Endothelzellen (HUVEC) konnte nachgewiesen werden, dass ICAM-1, CD11a/CD18 und in geringerem Maße auch CD11b/CD18 für die transzelluläre transendotheliale Migration von polymorphkernigen Neutrophilen wichtig sind [Schenkel et al., 2004, Yang et al., 2005]. Es ist noch nicht geklärt, inwieweit neben ICAM-1 und ICAM-2 weitere Adhäsionsmoleküle wie JAM-A, JAM-B oder JAM-C Einfluß haben auf das Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen, dem abrupten Adhären der Leukozyten und der transzellulären oder parazellulären transendothelialen Migration. In einem Mausmodell wurde nachgewiesen, dass JAM-A einen Liganden für CD11a/CD18 darstellt und dabei auch eine wesentliche Rolle bei der entzündlichen Immunantwort der Arthritis spielt [Watts et al., 2005]. Von Watts und seinen Kollegen wurde die I-Domäne der

α -Kette CD11a als mögliches Ziel für eine Therapie ausfindig gemacht. Auch für die Therapie des AE und der Pso wäre dies eine mögliche Option. Jedoch muss hierfür geklärt werden, inwieweit andere Integrine bei der Adhäsion der Monozyten an den Endothelzellen des Blutgefäßes eine Rolle spielen und die Funktion von CD11a/CD18 übernehmen können.

7 Zusammenfassung

Atopisches Ekzem (AE) und Psoriasis vulgaris (Pso) sind zwei weit verbreitete Erkrankungen der Haut, deren Ursachen noch nicht vollständig bekannt sind. Im Falle des AE ist bereits geklärt, dass die Expression des hochaffinen Rezeptors für IgE (Fc ϵ RI) auf den Monozyten und dendritischen Zellen (DC) beim Pathomechanismus der Erkrankung von großer Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurden die migratorischen und signalverstärkenden Fähigkeiten sowie die Allergenaufnahme und -präsentation von Monozyten und von zwei DC-Subtypen, den Langerhans Zellen (LC) und den inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC), untersucht.

Aus dem Blut von Patienten mit AE oder Pso und von gesunden Spendern, wurden Monozyten isoliert. Aus diesen wurden *in vitro* Mo-IDEC und Mo-LC generiert. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen wurde die Oberflächenexpression von einigen Rezeptoren auf den Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC untersucht. Diese Rezeptoren waren Selektine und Integrine (Marker für die Migrationsfähigkeit), Tetraspanine (Signalverstärkung), Fc-Rezeptoren, kostimulatorische Rezeptoren und MHC-Klasse I- und Klasse II-Rezeptoren. Des Weiteren wurden Mo-LC und Mo-IDEC mit IgE und anti-IgE-Antikörpern (zur Kreuzvernetzung des IgEs) stimuliert, um den Einfluss der Bindung von IgE an die Rezeptoren Fc ϵ RI und Fc ϵ RII/CD23 auf das Expressionsmuster der Selektine, Integrine und Tetraspanine zu untersuchen. Außerdem wurde die intrazelluläre Expression von Cytohesin-1 untersucht. Cytohesin-1 bindet an CD11a/CD18 (LFA-1, $\beta_2\alpha_L$) und verstärkt dabei die Affinität und Avidität dieses Integrin-Heterodimers.

Im Vergleich zu den Monozyten der gesunden Spender wurden CD62L (aus der Gruppe der Selektine), CD11a, CD18, CD49a und CD49d (aus der Gruppe der Integrine) sowie insbesondere CD53 und CD63, doch auch die meisten anderen untersuchten Tetraspanine auf den Monozyten beider Patientengruppen stärker exprimiert. Cytohesin-1 wurde ebenfalls in den Monozyten beider Patientengruppen stärker exprimiert als bei den gesunden Spendern. Monozyten von Patienten mit AE und Pso hätten somit eine gesteigerte Fähigkeit zur Mi-

gration. Für die unstimulierten Mo-IDEDEC von Patienten mit AE oder Pso wurde eine stärkere Expression einiger Integrine (insbesondere CD41 und CD49d) und Tetraspanine (insbesondere CD81, CD82 und CD151) nachgewiesen. Diese Expressionsmuster könnten ein Hinweis auf eine bessere Migrationsfähigkeit der Mo-IDEDEC sein, da die Tetraspanine mit den Integrinen auf der Oberfläche der Zellen interagieren können und damit die Migration der Zellen unterstützen können. Bei den unstimulierten Mo-LC zeigten sich hingegen nur geringe Unterschiede zwischen den drei Kollektiven. Bei Adhäsionsversuchen mit laminarer Strömung konnte ein verstärktes Rollen und Adhärenzen der unstimulierten Mo-IDEDEC und Mo-LC von Patienten mit AE oder Pso nachgewiesen werden. Weder bei den Mo-IDEDEC noch bei den Mo-LC wurde ein starker Einfluss der Stimulation mit IgE und anti-IgE-Antikörpern auf die Oberflächenexpression der Selektine, Integrine und Tetraspanine nachgewiesen.

Die veränderten migratorischen Eigenschaften der Monozyten und Mo-IDEDEC von Patienten mit AE oder Pso könnten eine wichtige Rolle für den Pathomechanismus beider Erkrankungen spielen. Für eine wirksame Therapie beider Erkrankungen sind Monozyten ein aussichtsreicher Ansatzpunkt, da sie die größten Unterschiede in der Oberflächenexpression der Selektine, Integrine und Tetraspanine im Vergleich zu den Monozyten des gesunden Kollektivs aufweisen. Durch die Verwendung neuer blockierender Moleküle gegen Selektine oder Integrine, speziell CD11a/CD18, könnte das Einwandern der Monozyten in die Haut gehemmt werden und der chronische Verlauf beider Erkrankungen gemildert werden.

A Anhang

A.1 Phänotypisierungsdaten der Oberflächenmarker

Expression der Selektine auf Monozyten

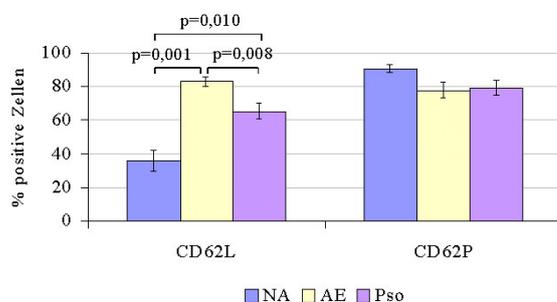


Abbildung A.1: Expression der Selektine CD62L und CD62P auf Monozyten aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 9$

Expression des Selektins CD62P auf Mo-LC

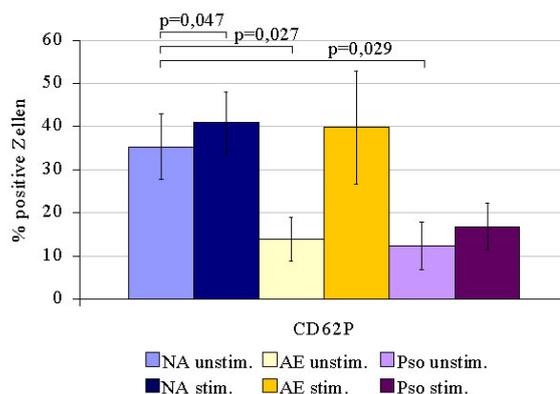


Abbildung A.2: Expression des Selektins CD62P auf Mo-LC in Angaben der prozentualen Anteile CD62P-positiver Zellen. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 7$, AE: $n = 8$, Pso: $n = 7$

II A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER

Expression des Selektins CD62P auf Mo-IDEc

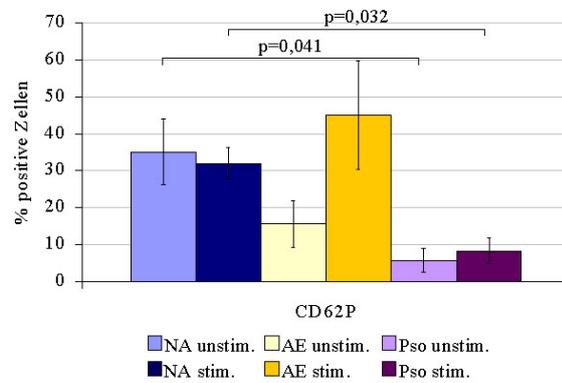


Abbildung A.3: Expression des Selektins CD62P auf Mo-IDEc in Angaben der prozentuale Anteile positiver Zellen. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 7$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 7$

A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER III

Expression der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten

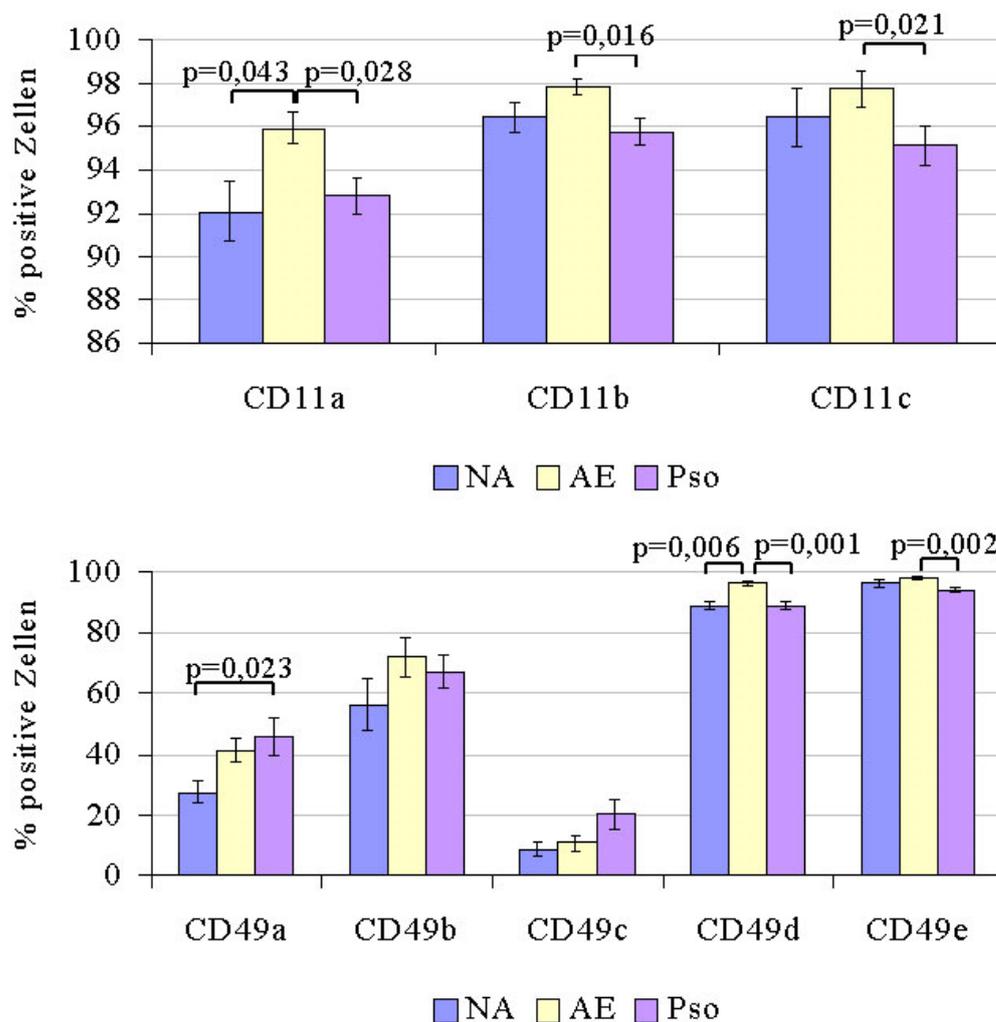


Abbildung A.4: Expression der α -Ketten (mit Ausnahme von CD41) von Integrinen auf Monozyten aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

IV A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER

Expression der α -Ketten der Integrine auf Mo-LC

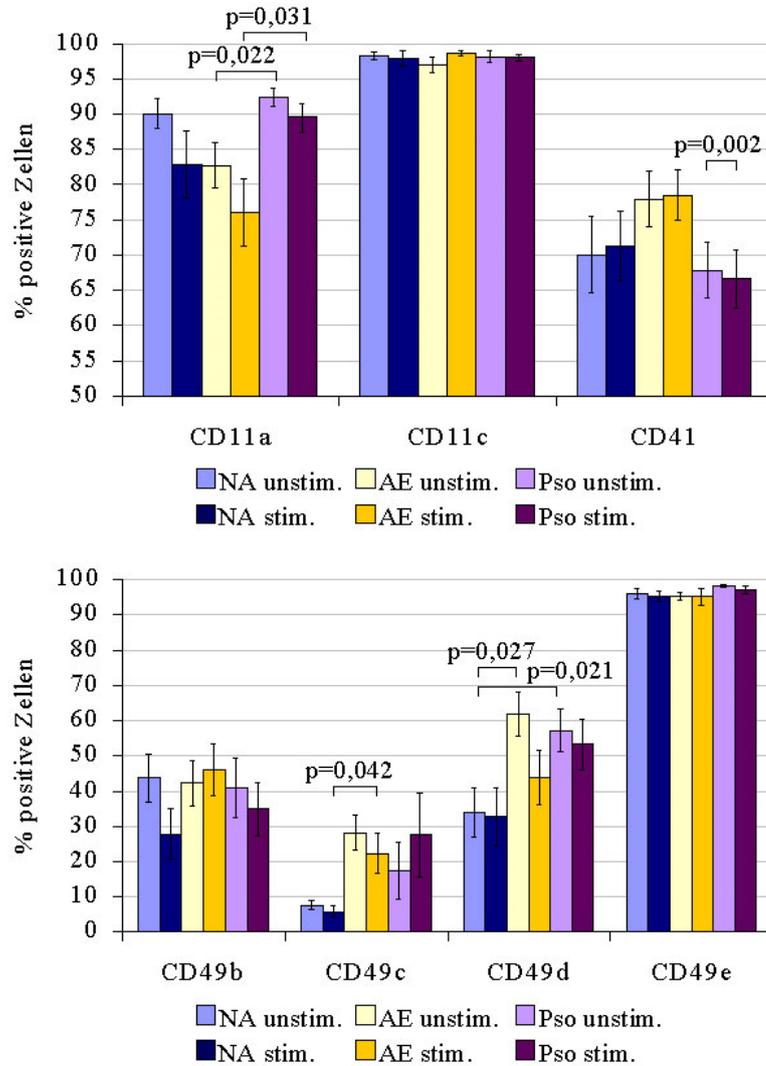


Abbildung A.5: Expression der α -Ketten CD11a, CD11c, CD41, CD49b, CD49c, CD49d und CD49e der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-LC aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 10$

Expression der α -Ketten der Integrine auf Mo-IDEC

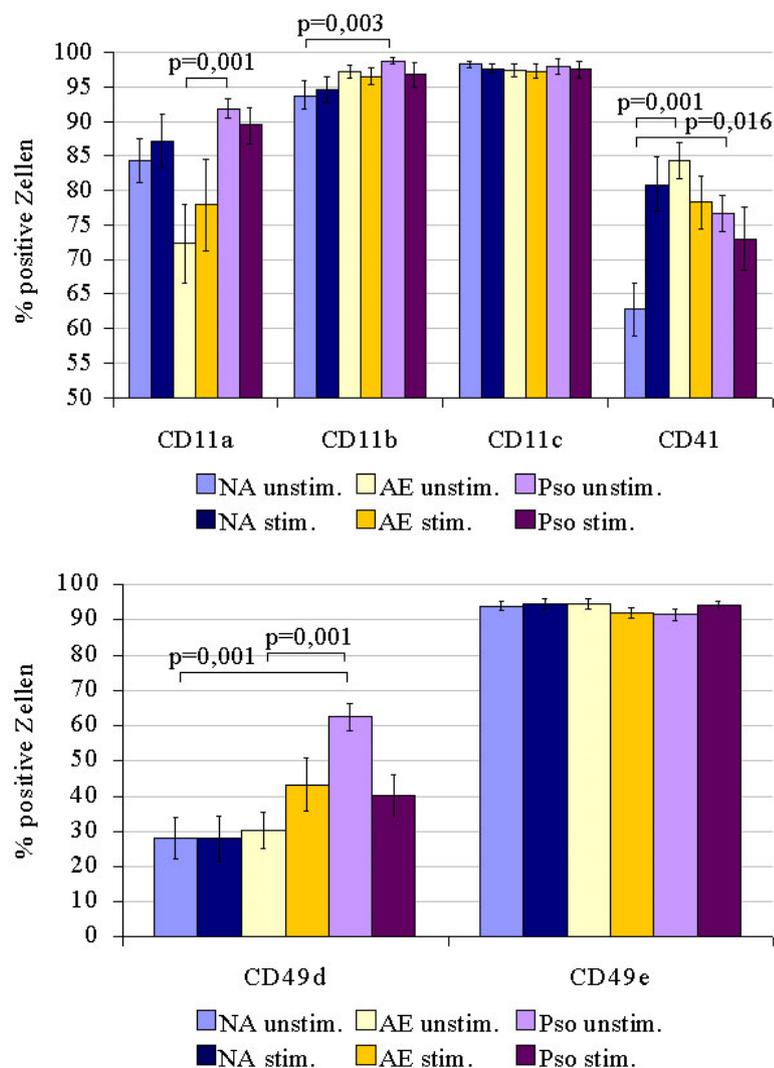


Abbildung A.6: Expression der α -Ketten CD11a, CD11b, CD11c, CD41, CD49d und CD49e der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-IDEC aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 11$

VI A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER

Expression der β -Ketten von Integrinen auf Monozyten

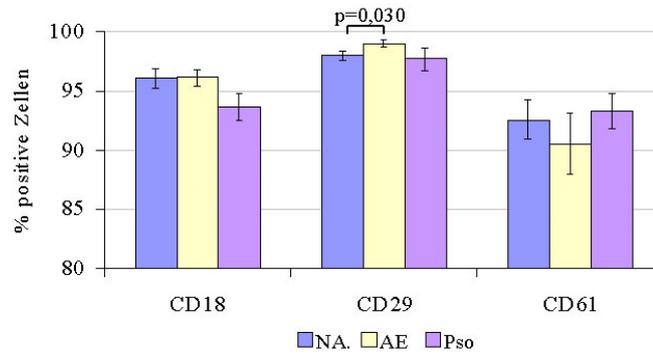


Abbildung A.7: Expression der β -Ketten von Integrinen auf Monozyten aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 12$, AE: $n = 12$, Pso: $n = 13$

Expression der β -Ketten der Integrine auf Mo-LC

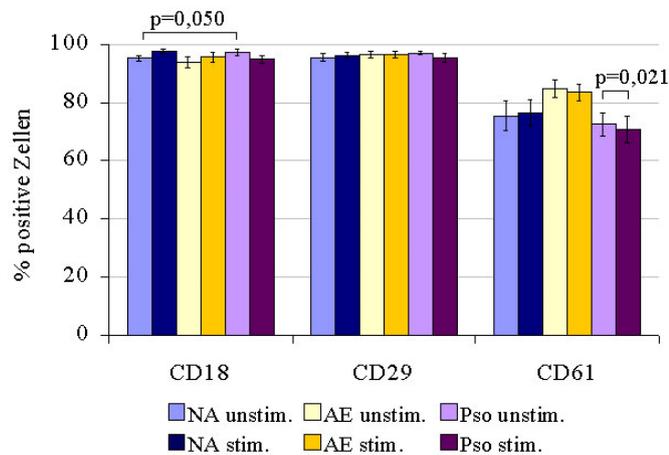


Abbildung A.8: Expression der β -Ketten der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-LC aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 13$

A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER VII

Expression der β -Ketten der Integrine auf Mo-IDEDEC

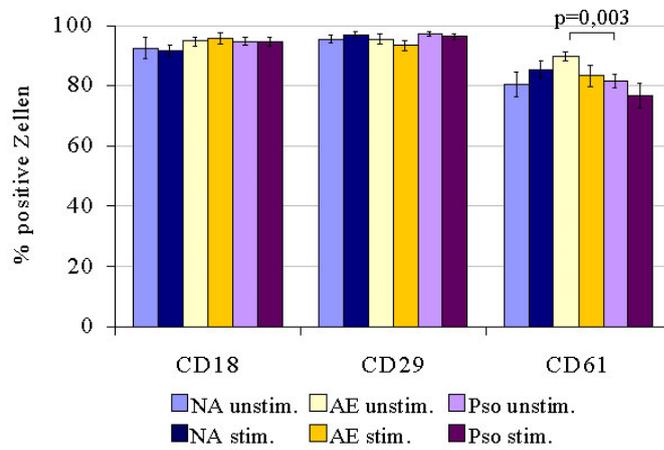


Abbildung A.9: Expression der β -Ketten der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-IDEDEC aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 11$, Pso: $n = 12$

VIIIA.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER

Expression der Tetraspanine auf Monozyten

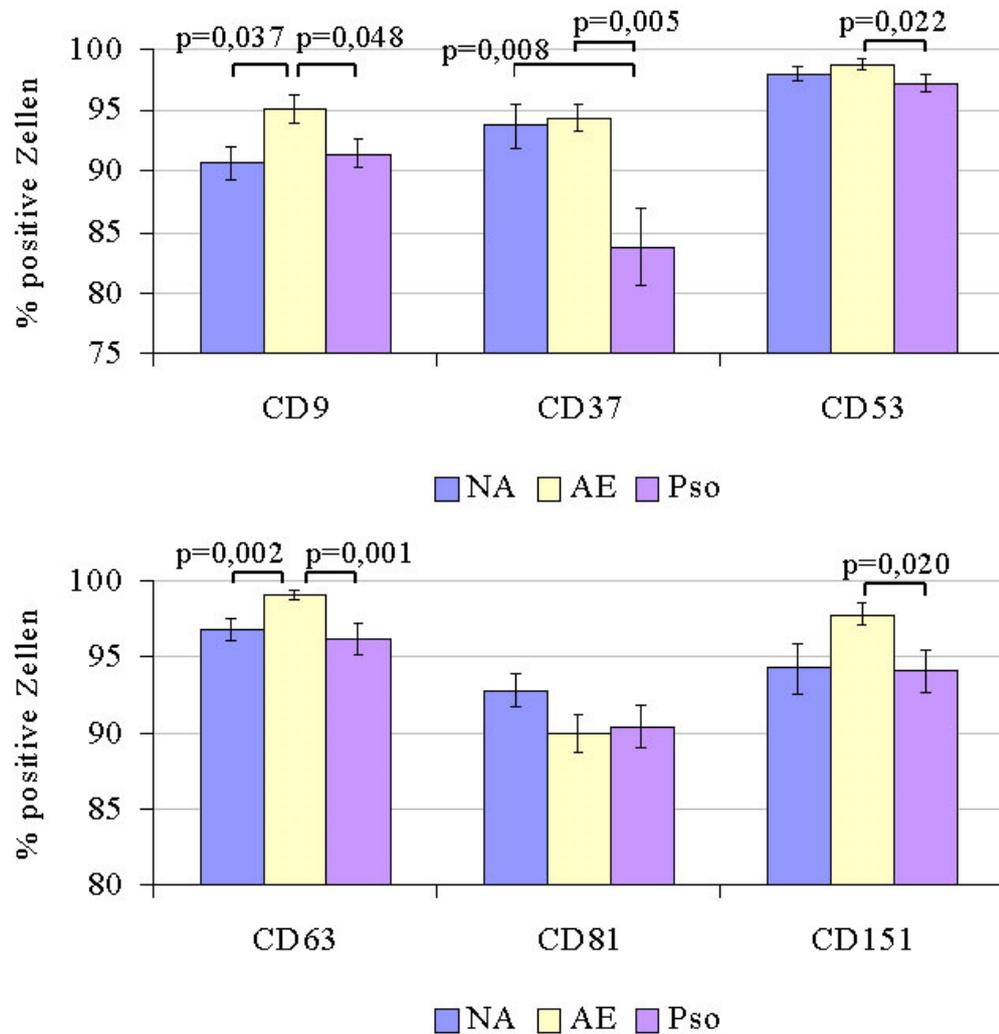


Abbildung A.10: Expression der Tetraspanine CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 und CD151 auf Monozyten aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 12$, AE: $n = 12$, Pso: $n = 13$

Expression der Tetraspanine auf Mo-LC

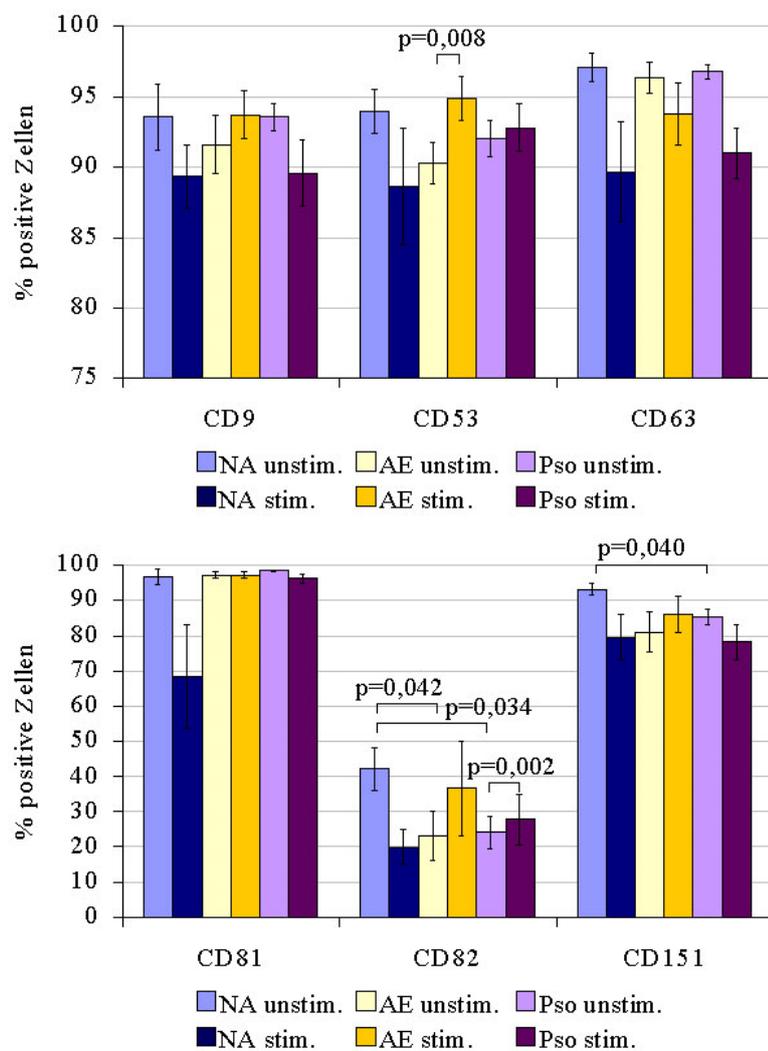


Abbildung A.11: Expression der Tetraspanine CD9, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-LC aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 9$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 15$

Expression der Tetraspanine auf Mo-IDEc

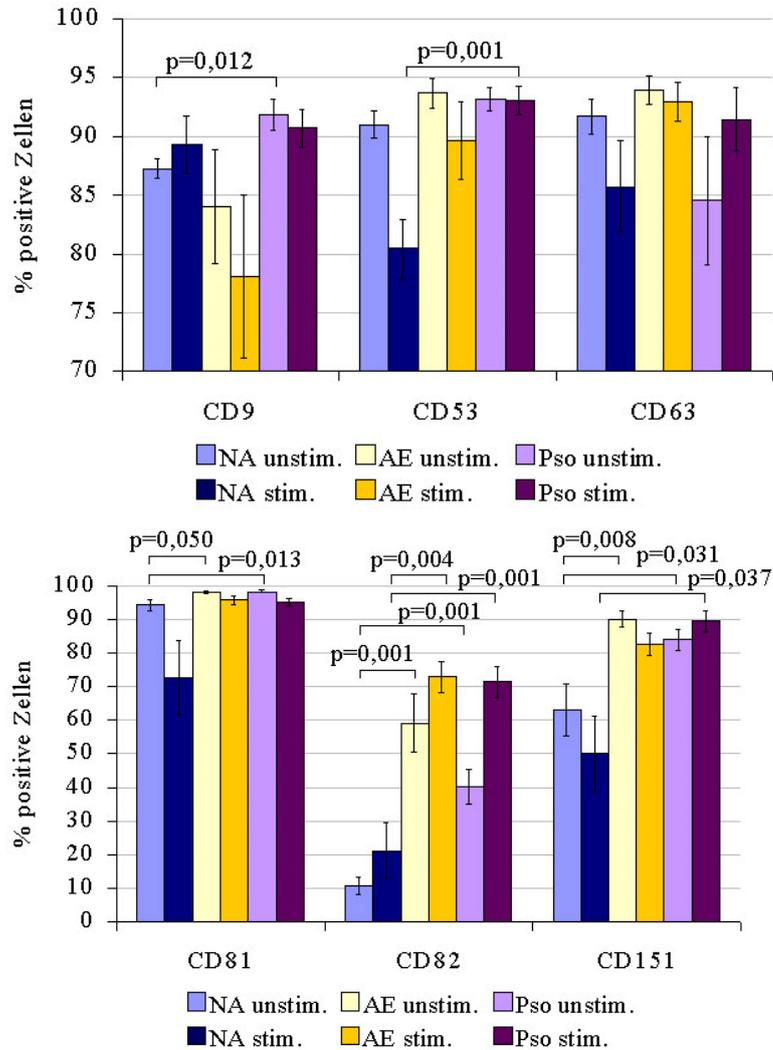


Abbildung A.12: Expression der Tetraspanine CD9, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 der Integrine auf unstimulierten und stimulierten Mo-IDEc aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 11$, AE: $n = 10$, Pso: $n = 12$

Expression der Fc-Rezeptoren auf Monozyten

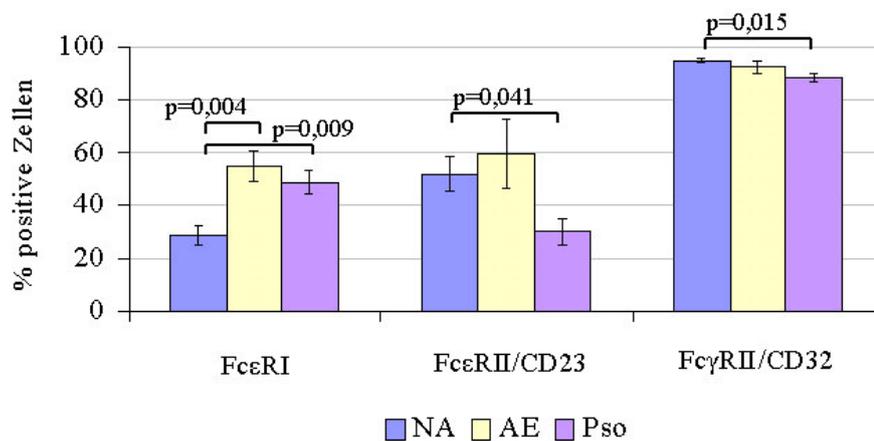
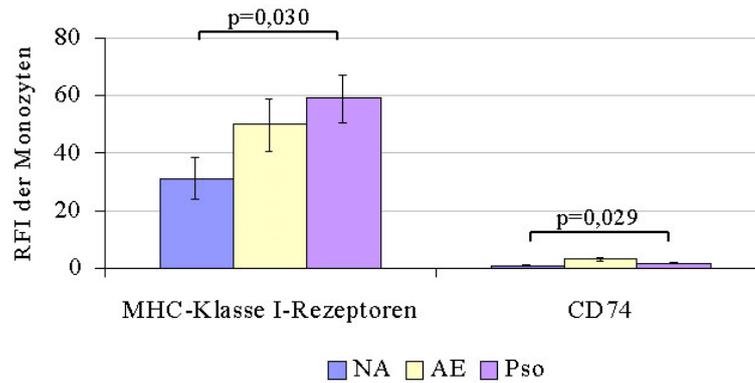


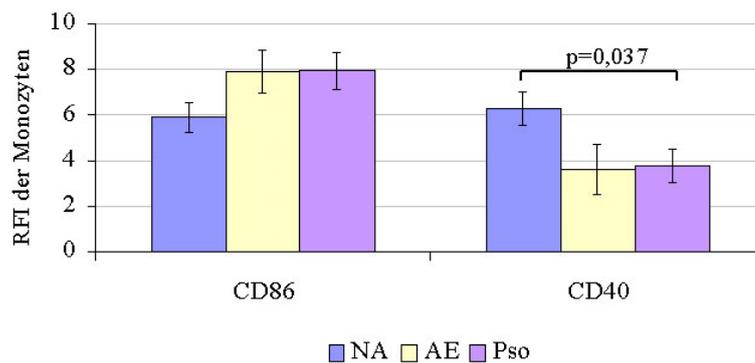
Abbildung A.13: Expression der Fc-Rezeptoren FcεRI, CD23 und CD32 auf Monozyten aufgetragen in prozentualen Werten der positiven Zellen auf der y-Achse. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 10$, AE: $n = 7$, Pso: $n = 10$

XII A.1 PHÄNOTYPISIERUNGSDATEN DER OBERFLÄCHENMARKER

Expression der MHC-Moleküle und einiger kostimulatorischer Rezeptoren auf Monozyten



(a) MHC-Rezeptoren



(b) kostimulatorische Rezeptoren

Abbildung A.14: Expression der Rezeptoren des MHC (a) und einiger kostimulatorischer Rezeptoren (CD86 und CD40; b) aufgetragen in Werten des RFI der Monozyten auf der y-Achse. Dargestellt sind der Mittelwert des RFI mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten $p \leq 0,050$ sind über den Balken angegeben. NA: $n = 13$, AE: $n = 9$, Pso: $n = 11$

A.2 Migrationsversuche

Repräsentative Filmausschnitte zu den Migrationsversuchen mit laminarer Strömung

A.3 Heterodimere der untersuchten Integrinketten

| Integrin | CD-Nummern | Trivialname | bekannte Liganden |
|------------------------|------------|--------------|---------------------------------------|
| β_1/α_1 | CD29/CD49a | VLA-1 | Kollagen, Laminin |
| β_1/α_2 | CD29/CD49b | VLA-2 | Kollagen, Laminin |
| β_1/α_3 | CD29/CD49c | VLA-3 | Fibronektin, Kollagen, Laminin |
| β_1/α_4 | CD29/CD49d | VLA-4 | Fibronektin, VCAM-1 |
| β_1/α_5 | CD29/CD49e | VLA-5 | Fibronektin |
| β_1/α_6 | CD29/CD49f | VLA-6 | Laminin |
| β_1/α_7 | CD29/- | | Laminin |
| β_1/α_8 | CD29/- | | Fibronektin, Vitronektin |
| β_1/α_9 | CD29/- | | Tenascin |
| β_1/α_{10} | CD29/- | | Laminin |
| β_1/α_{11} | CD29/- | | Laminin |
| β_1/α_v | CD29/CD51 | | Fibronektin, Vitronektin, Osteopontin |
| β_2/α_L | CD18/CD11a | LFA-1 | ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 |
| β_2/α_M | CD18/CD11b | Mac-1, CR3 | C3b, Fibrinogen, ICAM-1, VCAM-1 |
| β_2/α_X | CD18/CD11c | CR4, p150.95 | C3b, Fibrinogen, CD23 |
| β_2/α_D | CD18/CD11d | | ICAM-3, VCAM-1 |
| β_3/α_{IIb} | CD61/CD41 | GIIb/IIIa | Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin |
| β_3/α_v | CD61/CD51 | Vitronektin | Vitronektin, Kollagen, Fibrinogen |

A.4 Signifikante Unterschiede der Phänotypen

Hier befinden sich einige tabellarische Übersichten der nachgewiesenen signifikanten ($p \leq 0,050$; \uparrow) und hoch signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,001$; $\uparrow\uparrow$) bei der Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren (Selektine, Integrine, Tetraspanine, Fc-Rezeptoren, Rezeptoren des MHC und kostimulatorische Rezeptoren). Da die Unterschiede für die prozentualen Anteile und RFI-Werte die selben Tendenzen zeigen, wird in den tabellarischen Übersichten nicht auf prozentuale Werte und Werte des RFI getrennt eingegangen. Wenn für die Werte unterschiedlich starke Signifikanzen (einfach signifikant und hoch signifikant bzw. keine Signifikanz und einfach signifikant) festgestellt wurden, werden nur die stärksten Unterschiede beschrieben (hoch signifikant bzw. einfach signifikant).

Tabelle A.1: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der Selektine auf den Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Zellart | Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|-------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Monozyten | | | | |
| | CD62L | $\uparrow\uparrow$ | $\uparrow\uparrow$ | \uparrow |
| | CD62P | - | \uparrow | \downarrow |
| Mo-LC (unstim.) | | | | |
| | CD62P | \downarrow | - | \downarrow |
| Mo-LC (stim.) | | | | |
| | CD62P | - | - | \downarrow |
| Mo-IDEC (unstim.) | | | | |
| | CD62P | - | - | \downarrow |
| Mo-IDEC (stim.) | | | | |
| | CD62P | - | - | \downarrow |

Tabelle A.2: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der α -Ketten der Integrine auf den Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Zellart | Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|-------------------|------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| Monozyten | | | | |
| | CD11a | $\uparrow\uparrow$ | $\uparrow\uparrow$ | - |
| | CD11b | - | $\uparrow\uparrow$ | \downarrow |
| | CD11c | - | $\uparrow\uparrow$ | - |
| | CD49a | - | - | \uparrow |
| | CD49b | - | \uparrow | - |
| | CD49c | - | \downarrow | - |
| | CD49d | $\uparrow\uparrow$ | $\uparrow\uparrow$ | - |
| | CD49e | - | \uparrow | - |
| Mo-LC (unstim.) | | | | |
| | CD11a | \downarrow | \downarrow | - |
| | CD11c | - | \downarrow | \uparrow |
| | CD49b | \downarrow | - | - |
| | CD49d | \uparrow | - | \uparrow |
| | CD49e | \downarrow | \downarrow | - |
| Mo-LC (stim.) | | | | |
| | CD11a | - | \downarrow | - |
| | CD49c | \uparrow | - | - |
| Mo-IDEC (unstim.) | | | | |
| | CD11a | - | $\downarrow\downarrow$ | - |
| | CD11b | - | - | \uparrow |
| | CD11c | - | - | \uparrow |
| | CD41 | $\uparrow\uparrow$ | - | \uparrow |
| | CD49d | - | $\downarrow\downarrow$ | $\uparrow\uparrow$ |
| Mo-IDEC (stim.) | | | | |
| | CD11b | - | \downarrow | - |
| | CD49e | - | \downarrow | - |

Tabelle A.3: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der α -Ketten der Integrine **auf stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen** innerhalb eines untersuchten Kollektives

| Zellart | Antikörper | NA | AE | Pso |
|---------|------------|--------------|--------------|--------------|
| Mo-LC | | | | |
| | CD11a | - | - | \downarrow |
| | CD49e | \downarrow | - | - |
| Mo-IDEC | | | | |
| | CD11a | - | \uparrow | - |
| | CD11c | - | \downarrow | - |

Tabelle A.4: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der β -Ketten der Integrine auf den Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Zellart | Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|-------------------|------------|--------------------|--------------|------------|
| Monozyten | | | | |
| | CD18 | $\uparrow\uparrow$ | \uparrow | - |
| | CD29 | \uparrow | - | - |
| Mo-LC (unstim.) | | | | |
| | CD18 | - | \downarrow | \uparrow |
| Mo-LC (stim.) | | | | |
| | CD29 | - | - | \uparrow |
| Mo-IDEC (unstim.) | | | | |
| | CD18 | \downarrow | - | - |
| | CD61 | - | \uparrow | - |
| Mo-IDEC (stim.) | | | | |
| | CD29 | \downarrow | - | - |

Tabelle A.5: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der β -Ketten der Integrine **auf stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen** innerhalb eines untersuchten Kollektives

| Zellart | Antikörper | NA | AE | Pso |
|---------|------------|----|----|--------------|
| Mo-LC | | | | |
| | CD29 | - | - | \downarrow |
| Mo-IDEC | | | | |
| | CD29 | - | - | \downarrow |

Tabelle A.6: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der Tetraspanine auf den Monozyten, Mo-LC und Mo-IDEC **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Zellart | Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|-------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Monozyten | | | | |
| | CD9 | \uparrow | \uparrow | \uparrow |
| | CD37 | - | \uparrow | \downarrow |
| | CD53 | \uparrow | $\uparrow\uparrow$ | - |
| | CD63 | \uparrow | $\uparrow\uparrow$ | \uparrow |
| | CD81 | \downarrow | - | \downarrow |
| | CD151 | - | \uparrow | - |
| Mo-LC (unstim.) | | | | |
| | CD53 | - | - | \downarrow |
| | CD82 | \downarrow | - | \downarrow |
| | CD151 | - | - | \uparrow |
| Mo-LC (stim.) | | | | |
| | CD53 | \uparrow | - | - |
| | CD63 | - | \uparrow | - |
| | CD81 | \uparrow | - | - |
| Mo-IDEC (unstim.) | | | | |
| | CD9 | - | - | \uparrow |
| | CD53 | \uparrow | \uparrow | - |
| | CD63 | - | \uparrow | - |
| | CD81 | \uparrow | - | $\uparrow\uparrow$ |
| | CD82 | $\uparrow\uparrow$ | - | $\uparrow\uparrow$ |
| | CD151 | $\uparrow\uparrow$ | - | \uparrow |
| Mo-IDEC (stim.) | | | | |
| | CD53 | - | - | $\uparrow\uparrow$ |
| | CD81 | \uparrow | - | \uparrow |
| | CD82 | $-\uparrow$ | - | $\uparrow\uparrow$ |
| | CD151 | - | - | \uparrow |

Tabelle A.7: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der Tetraspanine **auf stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen** innerhalb eines untersuchten Kollektives

| Zellart | Antikörper | NA | AE | Pso |
|---------|------------|--------------|------------|--------------|
| Mo-LC | | | | |
| | CD9 | - | - | \downarrow |
| | CD53 | - | \uparrow | - |
| | CD81 | - | - | \downarrow |
| | CD151 | \downarrow | - | \downarrow |
| Mo-IDEK | | | | |
| | CD81 | - | - | \downarrow |

Tabelle A.8: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der Fc-Rezeptoren auf den Monozyten **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|------------------|------------|------------|--------------------|
| Fc ϵ RI | \uparrow | - | $\uparrow\uparrow$ |
| CD23 | \uparrow | \uparrow | \downarrow |
| CD32 | - | - | \downarrow |

Tabelle A.9: Signifikante (\uparrow) und hoch signifikante ($\uparrow\uparrow$) **Unterschiede** der Expression der Rezeptoren der MHC-Klasse I und Klasse II und der kostimulatorischen Rezeptoren auf den Monozyten **zwischen den drei untersuchten Kollektiven**

| Antikörper | AE zu NA | AE zu Pso | Pso zu NA |
|----------------|------------|-----------|--------------------|
| Rezeptoren des | | | |
| MHC-Klasse I | \uparrow | - | \uparrow |
| CD74 | \uparrow | - | $\uparrow\uparrow$ |
| CD86 | - | - | \uparrow |
| CD40 | - | - | \downarrow |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Schema der Einwanderung von Monozyten in die Haut, Antigen- / Allergenaufnahme der DC und deren anschließende Wande- rung in die Lymphgefäße | 6 |
| 2.2 | Hautschnitte im Vergleich | 9 |
| 2.3 | Rollen und Diapedese von Zellen im Blutstrom | 16 |
| 2.4 | Schema eines Tetraspanins | 21 |
| 2.5 | Schematische Darstellung von Cytohesin-1 | 22 |
| 4.1 | Aufbau der Durchflusskammer in Aachen | 42 |
| 4.2 | Auswertung am FACS | 46 |
| 5.1 | Histogramme der Selektine auf Monozyten | 57 |
| 5.2 | Expression der Selektine auf Monozyten (RFI) | 58 |
| 5.3 | Histogramme des Selektins CD62P auf Mo-LC und Mo-IDEC | 59 |
| 5.4 | Expression des Selektins CD62P auf Mo-LC (RFI) | 60 |
| 5.5 | Expression des Selektins CD62P auf Mo-IDEC (RFI) | 61 |
| 5.6 | Histogramme der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten (I) | 62 |
| 5.7 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten (RFI,I) | 63 |
| 5.8 | Histogramme der α -Ketten von Integrinen auf Mo-LC und Mo- IDEC (I) | 64 |
| 5.9 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-LC (RFI,I) | 65 |
| 5.10 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-IDEC (RFI,I) | 67 |
| 5.11 | Histogramme der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten (II) | 68 |
| 5.12 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten (RFI,II) | 69 |
| 5.13 | Histogramme der α -Ketten von Integrinen auf Mo-LC und Mo- IDEC (II) | 70 |
| 5.14 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-LC (RFI,II) | 71 |
| 5.15 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-IDEC (RFI,II) | 72 |
| 5.16 | Histogramme der β -Ketten von Integrinen auf Monozyten | 73 |
| 5.17 | Expression der β -Ketten von Integrinen auf Monozyten (RFI) | 74 |

| | | |
|------|---|-----|
| 5.18 | Histogramme der β -Ketten von Integrinen auf Mo-LC und Mo- IDEC | 75 |
| 5.19 | Expression von β -Ketten der Integrine auf Mo-LC (RFI) | 76 |
| 5.20 | Expression von β -Ketten der Integrine auf Mo-IDEC (RFI) | 77 |
| 5.21 | Histogramme der Tetraspanine auf Monozyten (I) | 79 |
| 5.22 | Expression der Tetraspanine auf Monozyten (RFI, I) | 80 |
| 5.23 | Histogramme des Tetraspanins CD9 auf unstimulierten Mo-LC und Mo-IDEC (I) | 81 |
| 5.24 | Expression von Tetraspaninen auf Mo-LC (RFI,I) | 82 |
| 5.25 | Expression von Tetraspaninen auf Mo-IDEC (RFI,I) | 83 |
| 5.26 | Histogramme der Tetraspanine auf Monozyten (II) | 84 |
| 5.27 | Expression der Tetraspanine auf Monozyten (RFI, II) | 85 |
| 5.28 | Histogramme der Tetraspanine auf unstimulierten Mo-LC und Mo-IDEC (II) | 87 |
| 5.29 | Expression von Tetraspaninen auf Mo-LC (RFI,II) | 88 |
| 5.30 | Expression von Tetraspaninen auf Mo-IDEC (RFI,II) | 89 |
| 5.31 | Expression der Fc-Rezeptoren auf Monozyten (RFI) | 91 |
| 5.32 | Expression der Rezeptoren des MHC auf Monozyten (%) | 93 |
| 5.33 | Expression kostimulatorischer Rezeptoren auf Monozyten (%) | 94 |
| 5.34 | Bilder der Adhäsionsversuche | 95 |
| 5.35 | Adhäsionsversuche von Mo-DC auf Endothelzellen | 96 |
| 5.36 | Nachweis von Cytohesin-1 bei verschiedenen Spendern | 97 |
| 5.37 | Diagramm zur Expression von Cytohesin-1 bei verschiedenen Zelltypen | 98 |
| 5.38 | Histogramme der Messungen von <i>Bet v 1</i> -FITC auf Mo-LC und Mo-IDEC | 101 |
| 5.39 | Diagramme zur <i>Bet v 1</i> Aufnahme bei Patienten mit AE | 102 |
| 6.1 | Mögliche Einflüsse der β_2 -Integrine beim AE und bei der Pso | 111 |
| 6.2 | Mögliche Einflüsse der β_1 -Integrine beim AE und bei der Pso | 115 |
| 6.3 | Mögliche Einflüsse der Tetraspanine auf den Monozyten beim AE und bei der Pso | 119 |
| 6.4 | Mögliche Einflüsse der Tetraspanine auf den Mo-LC und Mo- IDEC beim AE und bei der Pso | 123 |

| | | |
|------|--|------|
| A.1 | Expression der Selektine auf Monozyten (%) | I |
| A.2 | Expression des Selektins CD62P auf Mo-LC (%) | I |
| A.3 | Expression des Selektins CD62P auf Mo-IDEC (%) | II |
| A.4 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Monozyten (%) . . . | III |
| A.5 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-LC (%) | IV |
| A.6 | Expression der α -Ketten von Integrinen auf Mo-IDEC (%) | V |
| A.7 | Expression der β -Ketten von Integrinen auf Monozyten (%) . . . | VI |
| A.8 | Expression der β -Ketten von Integrinen auf Mo-LC (%) | VI |
| A.9 | Expression der β -Ketten von Integrinen auf Mo-IDEC (%) | VII |
| A.10 | Expression der Tetraspanine auf Monozyten (%) | VIII |
| A.11 | Expression der Teraspanine auf Mo-LC (%) | IX |
| A.12 | Expression der Teraspanine auf Mo-IDEC (%) | X |
| A.13 | Expression der Fc-Rezeptoren auf Monozyten (%) | XI |
| A.14 | Expression der Rezeptoren des MHC und der kostimulatorischen Rezeptoren auf Monozyten (RFI) | XII |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| 7AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| aa | Aminosäure(n) (engl.: amino acid(s)) |
| AE | atopisches Ekzem, Patient(en) mit atopischem Ekzem |
| APC | antigen-präsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>Bet v 1</i> | häufigstes Allergen der Birkenpolle |
| bidest. | bidestilliert |
| BSA | Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin) |
| CD | Zelloberflächenmarker (engl.: clustering of differentiation) |
| Cyh-1 | Cytohesin-1 |
| D | Dalton ($1D \cong 1,7 * 10^{-24} g$) |
| DC | dendritische Zellen; speziell auch: Population der IDEC und LC zusammengefasst |
| DF | Durchflusszytometrie |
| E_{595} | Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm |
| EC | extrazelluläre Schleife der Tetraspanine (z. b. EC1 oder EC2) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat |
| Fab | Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulin |
| FACS | Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting) |
| Fc | konstante Region von Immunglobulinen |
| ff. | folgende Seiten |
| FKS | Fötales Kälberserum, hier immer hitzeinaktiviert |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | Lichtstreuung in gerader Richtung (engl.: forward scatter) |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| GEF | Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl.: guanine nucleotide exchange factor) |
| GlyCAM-1 | (engl.: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) |

| | |
|------------------|---|
| GM-CSF | Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (engl.: granulocyte macrophages-colony stimulating factor) |
| HDMEC | humane dermale mikrovaskuläre Epithelzellen |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase) |
| ICAM | interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl.: inter-cellular adhesion molecule) |
| IDEC | inflammatorische dendritische epidermale Zellen |
| IFN | Interferon (z. B. IFN- γ) |
| Ig | Immunglobulin (z. B. IgE) |
| IL | Interleukin (z. B. IL-4) |
| LFA-1 | funktionelles Leukozytenantigen 1 (engl.: leucocyte function-associated antigen-1) |
| LC | Langerhans Zellen |
| MIIC | Kompartimente, die mit Rezeptoren der MHC-Klasse II angereichert sind |
| MCP-1 | (engl.: monocyte/macrophage chemoattractant protein 1) |
| β -Me | β -Mercaptoethanol |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex) |
| MFI | mittlere Fluoreszenz-Intensität |
| MIDAS | Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle |
| MIP | (engl.: macrophage inflammatory protein) |
| Mo | Monozyten (als Präfix: Monozyten als Herkunft) |
| $n =$ | Anzahl n der durchgeführten Versuche |
| NA | Nicht-Atopiker, auch gesunder Spender |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBMC | (engl.: peripheral blood mononuclear cell) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline) |
| PE | Phycoerythrin |
| PGE ₂ | Prostaglandine |
| PI 3K | Phosphatidylinositol 3 Kinase |
| PI 4K | Phosphatidylinositol 4 Kinase |

| | |
|----------------|--|
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSF | Phenylmethylylsulfonylfluorid |
| Pso | Psoriasis, Patient(en) mit Psoriasis |
| PSGL-1 | P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1) |
| RANTES | (engl.: regulated on activation normal T cells expressed and secreted) |
| rel. | relativ |
| RFI | relativer Fluoreszenzindex |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| spez. | spezifische |
| SSC | seitliche Lichtstreuung (engl.: sideward scatter) |
| stim. | stimuliert |
| TARC | Thymus und Aktivierung-regulierendes Chemokin (engl.: thymus and activation-regulated chemokine) |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: tris-buffered saline) |
| TBST | Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (engl.: tris-buffered saline with Tween 20) |
| Tc | T-Lymphocyte(n) |
| TGF- β | transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming growth factor - β) |
| T _H | T-Helfer-Zelle (z. B. T _H 1 oder T _H 2) |
| TM4SF | (engl.: transmembrane four super-family) |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor (engl.: tumor necrosis factor) |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat |
| T-Zelle (n) | T-Lymphocyten (n) |
| U | Unit(s): Einheit von Enzymaktivität |
| VCAM | vaskuläres Zelladhäsionsmolekül |
| vgl. | vergleiche |
| v/v | Verhältnis Volumen zu Volumen (engl.: volume to volume) |
| w/v | Verhältnis Masse zu Volumen (engl.: weight to volume) |
| WB | Western-Blot |
| WW | Wechselwirkung(en) |

Literaturverzeichnis

- [Abbassi et al., 1993] Abbassi, O., Kishimoto, T. K., McIntire, L. V., and Smith, C. W. (1993). Neutrophil adhesion to endothelial cells. *Blood Cells*, **19(2)**, 245.
- [Angelisova et al., 1994] Angelisova, P., Hilgert, I., and Horejsi, V. (1994). Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1 and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics*, **39(4)**, 249.
- [Atarashi et al., 2005] Atarashi, K., Hirata, T., Matsumoto, M., Kanemitsu, N., and Miyasaka, M. (2005). Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J Immunol*, **174(3)**, 1424.
- [Bahra et al., 1998] Bahra, P., Rainger, G. E., Wautier, J. L., Luu, N.-T., and Nash, G. B. (1998). Each step during transendothelial migration of flowing neutrophils is regulated by the stimulatory concentration of tumour necrosis factor- α . *Cell Adhes Commun*, **6(6)**, 491.
- [Balch et al., 1992] Balch, W. E., Kahn, R. A., and Schwaninger, R. (1992). ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmatic reticulum and the cis-Golgi compartment. *J Biol Chem*, **267(18)**, 13053.
- [Berditchevski et al., 1995] Berditchevski, F., Bazzoni, G., and Hemler, M. E. (1995). Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem*, **270(30)**, 17784.
- [Berditchevski et al., 2002] Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., and Gilbert, E. (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of $\alpha 3/\beta 1$ integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signalling. *J Biol Chem*, **277(40)**, 36991.

- [Berg et al., 1991] Berg, E. L., Robinson, M. K., Warnock, R. A., and Butcher, E. C. (1991). The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol*, **114**(2), 343.
- [Berman et al., 2003] Berman, A. E., Kozlova, N. I., and Morozovich, G. E. (2003). Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)*, **68**(12), 1597.
- [Bieber et al., 2000] Bieber, T., Kraft, S., Geiger, E., Wollenberg, A., Koch, S., and Novak, N. (2000). Fc ϵ RI expressing dendritic cells: the missing link in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Dermatol*, **27**(11), 698.
- [Birbeck et al., 1961] Birbeck, M. S., Breathnach, A. S., and Everall, J. D. (1961). An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol*, **37**, 51.
- [Boehm et al., 2003] Boehm, T., Hofer, S., Winklehner, P., Kellersch, B., Geiger, C., Trockenbacher, A., Neyer, S., Fiegl, H., Ebner, S., Ivarsson, L., Schneider, R., Kremmer, E., Heufler, C., and Kolanus, W. (2003). Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J*, **22**(5), 1014.
- [Boucheix et al., 2001] Boucheix, C., Duc, G. H., Jasmin, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med*, **0**, 1.
- [Boucheix and Rubinstein, 2001] Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*, **58**(9), 1189.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248.
- [Carloni et al., 2004] Carloni, V., Mazzoca, A., and Ravichandran, K. S. (2004). Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signalling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*, **23**(8), 1566.

- [Chang et al., 1994] Chang, J. C. C., Smith, L. R., and Froning, K. J. (1994). CD8⁺ T cells in psoriatic lesions preferentially use T cell receptor V β 3 and / or V β 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91(20)**, 9282.
- [Chardin et al., 1996] Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L., and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, **384(6608)**, 481.
- [Claas et al., 2001] Claas, C., Stipp, C. S., and Hemler, M. E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*, **276(11)**, 7974.
- [Classon et al., 1989] Classon, B. J., Williams, A. F., Willis, A. C., Seed, B., and Stamenkovic, I. (1989). The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *J Exp Med*, **169(4)**, 1497.
- [Companjen et al., 2000] Companjen, A. R., van dV, V., Vooys, A., Debets, R., Benner, R., and Prens, E. P. (2000). Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form. *Eur Cytokine Netw*, **11(3)**, 383.
- [Cumberbatch et al., 1997] Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β for migration. *Immunology*, **92(3)**, 388.
- [Curnock et al., 2002] Curnock, A. P., Logan, M., and Ward, S. G. (2002). Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology*, **105(2)**, 125.
- [Delves and Roitt, 2000] Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000). The immune system: first of two parts. *Advances in Research*, **343**, 37.
- [Dierks et al., 2001] Dierks, H., Kolanus, J., and Kolanus, W. (2001). Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain. *J Biol Chem*, **276(40)**, 37472.

- [Ding et al., 2003] Ding, Z., Issekutz, T. B., Downey, G. P., and Waddell, T. K. (2003). L-selectin stimulation enhances functional expression of CXCR4 in lymphocytes: implication for cellular activation during adhesion and migration. *Blood*, **101(11)**, 4245.
- [Dwir et al., 2003] Dwir, O., Solomon, A., Mangan, S., Kansas, G. S., Schwarz, U. S., and Alon, R. (2003). Avidity enhancement of L-selectin bonds by flow: shear-promoted rotation of leukocytes turn labile bonds into functional tethers. *J Cell Biol*, **163(3)**, 649.
- [Escola et al., 1998] Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, **273(32)**, 20121.
- [Fartasch, 1997] Fartasch, M. (1997). Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microsc Res Tech*, **38(4)**, 361.
- [Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1994] Forchhammer, K. and Tandeau de Marsac, N. (1994). The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J Bacteriol*, **176(1)**, 84.
- [Galkina et al., 2003] Galkina, E., Tanousis, K., Preece, G., Tolaini, M., Kioussis, D., Florey, O., Haskard, D. O., Tedder, T. F., and Ager, A. (2003). L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J Exp Med*, **198(9)**, 1323.
- [Geiger et al., 2000] Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeithmann, L., Dierks, H., Weber, K. S., and Kolanus, W. (2000). Cytohesin-1 regulates β_2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J*, **19(11)**, 2525.

- [Gfesser et al., 1996] Gfesser, M., Rakoski, J., and Ring, J. (1996). The disturbance of epidermal barrier function in atopy patch test reactions in atopic eczema. *Br J Dermatol*, **135**(4), 560.
- [Ghoreschi and Roecken, 2003] Ghoreschi, K. and Roecken, M. (2003). Immunopathogenese der Psoriasis. *JDDG*, **1**, 524.
- [Giagulli et al., 2004] Giagulli, C., Scarpini, E., Ottoboni, L., Narumiya, S., Butcher, E. C., Constantin, G., and Laudanna, C. (2004). RhoA and ζ -PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines. Critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte *in vivo* homing. *Immunity*, **20**(1), 25.
- [Girolomoni and Pastore, 2001] Girolomoni, G. and Pastore, S. (2001). The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, **45**(1 suppl.), S25.
- [Giustizieri et al., 2001] Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pita, O., Chinni, L., Giannetti, A., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, **107**(5), 871.
- [Groene, 2002] Groene, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, **88**, 1.
- [Gudjonsson et al., 2004] Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H., and Valdimarsson, H. (2004). Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*, **135**(1), 1.
- [Hanifin and Chan, 1995] Hanifin, J. M. and Chan, S. C. (1995). Monocyte phosphodiesterase abnormalities and dysregulation of lymphocyte function in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **105**(1 suppl.), 84S.
- [Harshyne et al., 2002] Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A., and Barratt-Boyes, S. M. (2002). Dendritic cells acquired antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol*, **166**(6), 3717.

- [He et al., 2004] He, B., Liu, L., Cook, G. A., Grgurevich, S., Jennings, L. K., and Zhang, X. A. (2004). Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin $\alpha 6$ -mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, **280(5)**, 3346.
- [Hemler, 1998] Hemler, M. E. (1998). Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **10(5)**, 578.
- [Hemler, 2003] Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 397.
- [Higginbottom et al., 2000] Higginbottom, A., Wilkinson, I., McCullough, B., Lanza, F., Azorsa, D. O., Partridge, L. J., and Monk, P. (2000). Antibody cross-linking of human CD9 and the high-affinity immunoglobulin E receptor stimulates secretion from transfected rat basophilic leukaemia cells. *Immunology*, **99(4)**, 546.
- [Hogg et al., 2003] Hogg, N., Laschinger, K., Giles, K., and McDowall, A. (2003). T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci*, **116(Pt 23)**, 4695.
- [Hotta et al., 1988] Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R., Tsujimoto, Y., Croce, C. M., and Koprowski, H. (1988). Molecular cloning and characterisation of an antigen associated with early stages of melanoma tumour progression. *Cancer Res*, **48(11)**, 2955.
- [Hwang et al., 1996] Hwang, S. T., Singer, M. S., Giblin, P. A., Yednock, T. A., Bacon, K. B., Simon, S. I., and Rosen, S. D. (1996). GlyCAM-1, a physiological ligand for L-selectin, activates β_2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med*, **184(4)**, 1343.
- [Janeway et al., 2002] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2002). *Immunobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin und Heidelberg, fifth edition.

- [Jung, 1995] Jung, E. G. (1995). *Dermatologie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, third edition.
- [Juttila et al., 1989] Juttila, M. A., Rott, L., Berg, E. L., and Butcher, E. C. (1989). Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen *in vivo*: comparison with LFA-1 and Mac-1. *J Immunol*, **143**(10), 3318.
- [Kaji et al., 2001] Kaji, K., Takeshita, S., Miyake, K., Takai, T., and Kudo, A. (2001). Functional association of CD9 with the FC γ receptors in macrophages. *J Immunol*, **166**(5), 3256.
- [Kakinuma et al., 2001] Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K., and Tamaki, K. (2001). Thymus and activation regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with diseases activity. *J Allergy Clin Immunol*, **107**(3), 535.
- [Karamatic Crew et al., 2004] Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C. A., Levene, C., Flinter, F., Brady, R. L., Daniels, G., and Anstee, D. J. (2004). CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood*, **104**(8), 2217.
- [Kashihara et al., 1986] Kashihara, M., Ueda, M., Horiguchi, Y., Furukawa, F., Hanaoka, M., and Imamura, S. (1986). A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, **87**(5), 602.
- [Kazarov et al., 2002] Kazarov, A. R., Yang, X., Stipp, C. S., Sehgal, B., and Hemler, M. E. (2002). An extracellular site on tetraspanin CD151 determines α 3 and α 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol*, **158**(7), 1299.
- [Kim, 2004] Kim, C. H. (2004). Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **4**(4), 343.

- [Kishimoto et al., 1989] Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., Berg, E. L., and Butcher, E. C. (1989). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*, **245(4923)**, 1238.
- [Kissenpfennig et al., 2005] Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., and Malissen, B. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells *in vivo*: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*, **22(5)**, 643.
- [Kitani et al., 1991] Kitani, S., Berenstein, E., Mergenhagen, S., Tempst, P., and Siraganian, R. P. (1991). A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *J Biol Chem*, **266(3)**, 1903.
- [Knorr et al., 2000] Knorr, T., Nagel, W., and Kolanus, W. (2000). Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur J Biochem*, **267(12)**, 3784.
- [Kohno et al., 2004] Kohno, Y., Tanimoto, A., Cirathaworn, C., Shimajiri, S., Tawara, A., and Sasaguri, Y. (2004). GM-CSF activates RhoA, integrin and MMP expression in human monocytic cells. *Pathol Int*, **54(9)**, 693.
- [Kolanus et al., 1996] Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Goddar, S., Stockinger, H., and Seed, B. (1996). α L β 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, **86(2)**, 233.
- [Kolanus and Zeitlmann, 1998] Kolanus, W. and Zeitlmann, L. (1998). Regulation of integrin function by inside-out signaling mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*, **231**, 33.
- [Kraft et al., 2005] Kraft, S., Fleming, T., Billingsley, J. M., Lin, S. Y., Jouvin, M. H., Storz, P., and Kinet, J. P. (2005). Anti-CD63 antibodies suppress

- IgE-dependent allergic reactions *in vitro* und *in vivo*. *J Exp Med*, **201(3)**, 385.
- [Kraft et al., 1998] Kraft, S., Wessendorf, J. H., Hanau, D., and Bieber, T. (1998). Regulation of the high affinity receptor for IgE on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol*, **161(2)**, 1000.
- [Kropshofer et al., 2002] Kropshofer, H., Spindeldreher, S., Rohn, T. A., Platania, N., Grygar, C., Daniel, N., Wolpl, A., Langen, H., Horejsi, V., and Vogt, A. B. (2002). Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol*, **3(1)**, 61.
- [Kukreti et al., 1997] Kukreti, S., Konstantopoulos, K., Smith, C. W., and McIntire, L. V. (1997). Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1 β -stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood*, **89(11)**, 4104.
- [Kunkel et al., 1997] Kunkel, E. J., Jung, U., and Ley, K. (1997). TNF- α induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles. *Am J Physiol*, **272(3 Pt 2)**, H1391.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227(5259)**, 680.
- [Lagaudriere-Gesbert et al., 1997] Lagaudriere-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., Conjeaud, H., and Rubinstein, E. (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol*, **182(2)**, 105.
- [Lammerding et al., 2003] Lammerding, J., Kazarov, A. R., Huang, H., Lee, R. T., and Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin CD151 regulates $\alpha 6\beta 1$ integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100(13)**, 7616.
- [Langerhans, 1868] Langerhans, P. (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchow Arch Path Anat*, **44**, 325.

- [Laudanna, 2005] Laudanna, C. (2005). Integrin activation under flow: a local affair. *Nature Immunol*, **6(5)**, 429.
- [Laudanna et al., 1998] Laudanna, C., Mochly-Rosen, D., Liron, T., Constantin, G., and Butcher, E. C. (1998). Evidence of ζ protein kinase C involvement in polymorphnuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem*, **273(46)**, 30306.
- [Lee et al., 1995] Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., and Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the β subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, **80(4)**, 631.
- [Leitinger and Hogg, 2000] Leitinger, B. and Hogg, N. (2000). Effects of I domain deletion on the function of the β_2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol Biol Cell*, **11(2)**, 677.
- [Leung and Bieber, 2003] Leung, D. Y. and Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet*, **361(9352)**, 151.
- [Levy and Shoham, 2005] Levy, S. and Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*, **5(2)**, 136.
- [Levy et al., 1998] Levy, S., Todd, S. C., and Maecker, H. T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **16**, 89.
- [Lipscomb and Masten, 2002] Lipscomb, M. F. and Masten, B. J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*, **82(1)**, 97.
- [Liu and Pohajdak, 1992] Liu, L. and Pohajdak, B. (1992). Cloning and sequencing of a human cDNA from cytolytic NK/T cells with homology to yeast SEC7. *Biochim Biophys Acta*, **1132(1)**, 75.
- [Lund-Johansen and Olweus, 1999] Lund-Johansen, F. and Olweus, J. (1999). Dendritiske celler - sterke kandidater for immunterapi. *Tidsskr Nor Laegeforen*, **119(17)**, 2510.

- [Mailliard et al., 2002] Mailliard, R. B., Egawa, S., Cai, Q., Kalinska, A., Bykovskaya, S. N., Lotze, M. T., Kapsenberg, M. L., Storkus, W. J., and Kalinski, P. (2002). Complementary dendritic cellactivating function of CD8⁺ and CD4⁺ T cells: helper role of CD8⁺ Tcell in development of T helper type 1 response. *J Exp Med*, **195**(4), 473.
- [Mannion et al., 1996] Mannion, B. A., Berditchevski, F., Kraeft, S. K., Chen, L.-B., and Hemler, M. E. (1996). Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63 and CD53 specifically associated with integrin $\alpha4\beta1$ (CD49d/CD29). *J Immunol*, **157**(5), 2039.
- [Mantegazza et al., 2004] Mantegazza, A., Barrio, M. M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., Teillaud, J.-L., and Mordoh, J. (2004). CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*, **104**(4), 1183.
- [Mascia et al., 2003] Mascia, F., Mariani, V., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2003). Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am J Pathol*, **163**(1), 303.
- [Mayer et al., 2001] Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Boehm, T., Knorr, T., Jackson, C. L., Kolanus, W., and Famulok, M. (2001). Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(9), 4961.
- [McGowan and Coulomb, 1998] McGowan, K. and Coulomb, P. A. (1998). The wound repair-associated keratins 6, 16 and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture. *Subcell Biochem*, **31**, 173.
- [Meacci et al., 1997] Meacci, E., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J., and Vaughan, M. (1997). Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(5), 1745.

- [Menssen et al., 1995] Menssen, A., Trommler, P., and Vollmer, S. (1995). Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol*, **155**(8), 4078.
- [Moseley, 2005] Moseley, G. W. (2005). Tetraspanin-Fc receptor interactions. *Platelets*, **16**(1), 3.
- [Moss and Vaughan, 2002] Moss, J. and Vaughan, M. (2002). Cytohesin-1 in 2001. *Arch Biochem Biophys*, **397**(2), 156.
- [Nagel et al., 1998a] Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L., and Kolanus, W. (1998a). The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol Biol Cell*, **9**(8), 1981.
- [Nagel et al., 1998b] Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J., and Kolanus, W. (1998b). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the $\beta 2$ integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem*, **273**(24), 14853.
- [Nakanishi et al., 2001] Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, **12**(1), 53.
- [Nickoloff and Wrona-Smith, 1999] Nickoloff, B. J. and Wrona-Smith, T. (1999). Injection of pre-psoriatic skin with CD4⁺ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*, **155**(1), 145.
- [Novak et al., 2002a] Novak, N., Allam, J. P., Geiger, E., and Bieber, T. (2002a). Characterization of monocyte subtypes in the allergic form of atopic eczema/dermatitis syndrome. *Allergy*, **57**(10), 931.
- [Novak et al., 2001a] Novak, N., Bieber, T., and Katoh, N. (2001a). Engagement of Fc ϵ RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J Immunol*, **167**(2), 797.

- [Novak et al., 2003a] Novak, N., Bieber, T., and Leung, D. Y. (2003a). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **112**(6 suppl.), S128.
- [Novak et al., 2001b] Novak, N., Kraft, S., and Bieber, T. (2001b). IgE receptors. *Curr Opin Immunol*, **13**(6), 721.
- [Novak et al., 2002b] Novak, N., Kraft, S., Habersack, J., Geiger, E., Allam, P., and Bieber, T. (2002b). A reducing microenvironment leads to the generation of Fc ϵ RI high inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). *J Invest Dermatol*, **119**(4), 842.
- [Novak et al., 2005] Novak, N., Kwiek, B., and Bieber, T. (2005). The mode of topical immunomodulators in the immunological network of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*, **30**(2), 160.
- [Novak et al., 2003b] Novak, N., Tepel, C., Koch, S., Brix, K., Bieber, T., and Kraft, S. (2003b). Evidence for a differential expression of the Fc ϵ RI γ chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest*, **111**(7), 1047.
- [Novak et al., 2004] Novak, N., Valenta, R., Bohle, B., Laffer, S., Habersack, J., Kraft, S., and Bieber, T. (2004). Fc ϵ RI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol*, **113**(5), 949.
- [Olofsson et al., 1994] Olofsson, A. M., Arfors, K. E., Ramezani, L., Wolitzky, B. A., Butcher, E. C., and von Andrian, U. H. (1994). E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood*, **84**(8), 2749.
- [Olweus et al., 1993] Olweus, J., Lund-Johansen, F., and Horejsi, V. (1993). CD53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and B cells. *J Immunol*, **151**(2), 707.

- [Oren et al., 1990] Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., and Levy, S. (1990). TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*, **10(8)**, 4007.
- [Pastore et al., 1997] Pastore, S., Fanales-Belasio, E., Albanesi, C., Chinni, L. M., Gianetti, A., and Girolomoni, G. (1997). Granulocytes macrophage-colony stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest*, **99(12)**, 3009.
- [Pastore et al., 2000] Pastore, S., Mascia, F., Giustizieri, M. L., Gianetti, A., and Girolomoni, G. (2000). Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **48(6)**, 497.
- [Perez et al., 2003] Perez, O. D., Mitchell, D., Jager, G. C., South, S., Muriel, C., McBride, J., Herzenberg, L. A., Kinoshita, S., and Nolan, G. P. (2003). Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol*, **4(11)**, 1083.
- [Peterson et al., 2005] Peterson, M. D., Jin, R., Hyduk, S., Duchesneau, P., Cybulsky, M. I., and Waddell, T. K. (2005). Monocyte adhesion to xenogeneic endothelium during laminar flow is dependent on α -Gal-mediated monocyte activation. *J Immunol*, **174(2)**, 8072.
- [Petit et al., 2005] Petit, I., Goichberg, P., Spiegel, A., Peled, A., Brodie, C., Seger, R., Nagler, A., Alon, R., and Lapidot, T. (2005). Atypical PKC- ζ regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34⁺ progenitor cells. *J Clin Invest*, **115(1)**, 168.
- [Prinz, 2003] Prinz, J. C. (2003). Neueste Aspekte in der Pathogenese der Psoriasis. *Der Hautarzt*, **54(3)**, 209.
- [Radford et al., 1997] Radford, K. J., Thorne, R. F., and Hersey, P. (1997). Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol*, **158(7)**, 3353.

- [Ramirez and Sigal, 2001] Ramirez, M. C. and Sigal, L. J. (2001). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol*, **169**(12), 6733.
- [Rattis et al., 1996] Rattis, F. M., Peuguet-Navarro, J., Staquet, M. J., Dezutter-Dambuyant, C., Courtellemont, P., Redziniak, G., and Schmitt, D. (1996). Expression and function of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol*, **26**(2), 449.
- [Reich et al., 2001] Reich, K., Heine, A., Hugo, S., Blaschke, V., Middel, P., and Kaser, A. (2001). Engagement of the Fc ϵ RI stimulates the production of IL-6 in Langerhans cell-like dendritic cells. *J Immunol*, **167**(11), 6321.
- [Rele et al., 2005] Rele, S. M., Cui, W., Wang, L., Hou, S., Barr-Zarse, G., Tatton, D., Gnanou, Y., Esko, J. D., and Chaikof, E. L. (2005). Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J Am Chem Soc*, **127**(29), 10132.
- [Rivera-Nieves et al., 2005] Rivera-Nieves, J., Olson, T., Bamias, G., Bruce, A., Solga, M., Knight, R. F., Hoang, S., Cominelli, F., and Ley, K. (2005). L-selectin, $\alpha_4\beta_1$, and $\alpha_4\beta_7$ integrins participate in CD4⁺ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *J Immunol*, **174**(4), 2343.
- [Robert and Kupper, 1999] Robert, C. and Kupper, T. S. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells and immune surveillance. *N Engl J Med*, **341**(24), 1817.
- [Roep, 2002] Roep, B. O. (2002). Autoreactive T cells in endocrine/organ-specific autoimmunity: why has progress been so slow? *Springer Semin Immunopathol*, **24**, 261–271.
- [Romani et al., 1989] Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdic, O., Fritsch, P., and Schuler, G. (1989). Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol*, **93**(5), 600.

- [Ronchetti et al., 1999] Ronchetti, A., Iezzi, G., and Crosti, M. C. (1999). Role of antigen-presenting cells in cross-priming of cytotoxic T lymphocytes by apoptotic cells. *J Leukoc Biol*, **66(2)**, 247.
- [Sallusto and Lanzavecchia, 1994] Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med*, **179(4)**, 1109.
- [Sambrook et al., 1989] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. CSH, Cold Spring, second edition.
- [Sandilands et al., 2005] Sandilands, G. P., Ahmed, Z., Perry, N., Davison, M., Lupton, A., and Young, B. (2005). Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*, **114(3)**, 354.
- [Schenkel et al., 2004] Schenkel, A. R., Mamdough, Z., and Muller, W. A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, **5(4)**, 393.
- [Schwarz and Alon, 2004] Schwarz, U. S. and Alon, R. (2004). L-selectin-mediated leukocyte tethering in shear flow is controlled by multiple contacts and cytoskeletal anchorage facilitating fast rebinding events. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101(18)**, 6940.
- [Shamri et al., 2005] Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J. M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M. K., Staunton, D. E., von Andrian, U. H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature Immunol*, **6(5)**, 497.
- [Sheikh et al., 2005] Sheikh, S., Rahman, M., Gale, Z., Luu, N. T., Stone, P. C. W., Matharu, N., Rainger, G. E., and Nash, G. B. (2005). Differing mechanisms of leukocyte recruitment and sensitivity to conditioning by

shear stress for endothelial cells treated with tumour necrosis factor- α or interleukin-1 β . *Br J Pharmacol*, **148(8)**, 1052.

[Shibagaki et al., 1999] Shibagaki, N., Hanada, K., Yamashita, H., Shimada, S., and Hamada, H. (1999). Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol*, **29(12)**, 4081.

[Simon et al., 1995] Simon, S. I., Burns, A. R., Taylor, A. D., Gopalan, P. K., Lynam, E. B., Sklar, L. A., and Smith, C. W. (1995). L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) β_2 -integrin. *J Immunol*, **155(3)**, 1502.

[Sims and Dustin, 2002] Sims, T. N. and Dustin, M. L. (2002). The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev*, **186**, 100.

[Skubitz et al., 1996] Skubitz, K. M., Campbell, K. D., Iida, J., and Skubitz, A. P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol*, **157(8)**, 3617.

[Smalley and Ley, 2005] Smalley, D. M. and Ley, K. (2005). L-selectin: mechanism and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*, **9(2)**, 255.

[Steinman et al., 1975] Steinman, R. M., Adams, J. C., and Cohn, Z. A. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*, **141(4)**, 804.

[Steinman and Cohn, 1973] Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, **137(5)**, 1142.

[Steinman and Cohn, 1974] Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*, **139(2)**, 380.

- [Stipp et al., 2003] Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., and Hemler, M. E. (2003). EWI-2 regulates $\alpha 3\beta 1$ integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol*, **163**(5), 1167.
- [Stipp et al., 2001] Stipp, C. S., Orlicky, D., and Hemler, M. E. (2001). FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem*, **276**(7), 4853.
- [Stoyan, 1993] Stoyan, D. (1993). *Stochastik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Akademie Verlag, Berlin, first edition.
- [Szollosi et al., 1996] Szollosi, J., Horejsi, V., Bene, L., Angelisova, P., and Damjanovich, S. (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol*, **157**(7), 2939.
- [Tang et al., 1993] Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., and Udey, M. C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediates by E-cadherin. *Nature*, **361**(6407), 82.
- [Tarrant et al., 2003] Tarrant, J. M., Robb, L., van Spriell, A. B., and Wright, M. D. (2003). Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol*, **24**(11), 610.
- [Theis et al., 2004] Theis, M. G., Knorre, A., Kellersch, B., Moelleken, J., Wieland, F., Kolanus, W., and Famulok, M. (2004). Discriminatory adaptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(31), 11221.
- [Tohami et al., 2004] Tohami, T., Drucker, L., Radnay, J., Shapira, H., and Lishner, M. (2004). Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions. *Tissue Antigens*, **64**(3), 235.
- [Tsai et al., 1987] Tsai, S. C., Noda, M., Adamik, R., Moss, J., and Vaughan, M. (1987). Enhancement of cholera toxin ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19 kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**(15), 5139.

- [Turley et al., 2000] Turley, S. J., Inaba, K., Garret, W. S., Ebersold, M., Unternaeher, J., Steinmann, R. M., and Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, **288(5465)**, 522.
- [Valdimarsson et al., 1995] Valdimarsson, H., Baker, B. S., Jonsdottir, I., Powles, A., and Fry, L. (1995). Psoriasis: a T cell mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today*, **16(3)**, 145.
- [Van Niel et al., 2003] Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*, **52(12)**, 1690.
- [van Rijt et al., 2005] van Rijt, L. S., Jung, S., KleinJan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2005). *In vivo* depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med*, **201(6)**, 981.
- [Venturi et al., 2003] Venturi, G. M., Tu, L., Kadono, T., Khan, A. I., Fujimoto, Y., Oshel, P., Bock, C. B., Miller, A. S., Albrecht, R. M., Kubes, P., Steeber, D. A., and Tedder, T. F. (2003). Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*, **19(5)**, 713.
- [Vissers et al., 2004] Vissers, W. H., Arndtz, C. H., Muys, L., Van Erp, P. E., de Jong, E. M., and van de Kerkhof, P. C. (2004). Memory effector (CD45RO⁺) and cytotoxic (CD8⁺) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol*, **150(5)**, 852.
- [von Andrian et al., 1992] von Andrian, U. H., Hansell, P., Chambers, J. D., Berger, E. M., Torres, F., Butcher, E. C., and Arfors, K. E. (1992). L-selectin function is required for β 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates *in vivo*. *Am J Physiol*, **263(4 Pt 2)**, H1034.
- [Vrtala et al., 2000] Vrtala, S., Akdis, C. A., Budak, F., Akdis, M., Blaser, K., Kraft, D., and Valenta, R. (2000). T cell epitope-containing hypoallergenic

recombinant fragments of the major birch pollen allergen, *Bet v 1*, induce blocking antibodies. *J Immunol*, **165(11)**, 6653.

[Vrtala et al., 2001] Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Susani, M., Akdis, M., Kussebi, F., Akdis, C. A., Blaser, K., Hufnagl, P., Binder, B. R., Politou, A., Pastore, A., Vangelista, L., Sperr, W. R., Semper, H., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., and Valenta, R. (2001). Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen *Bet v 1*. *FASEB J*, **15(11)**, 2045.

[Vrtala et al., 1997] Vrtala, S., Hirtenlehner, K., Vangelista, L., Pastore, A., Eichler, H. G., Sperr, W. R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., and Valenta, R. (1997). Conversion of the major birch pollen allergen, *Bet v 1*, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J Clin Invest*, **99(7)**, 1673.

[Watts et al., 2005] Watts, G. M., Beurskens, F. J. M., Martin-Padura, I., Ballantyne, C. M., Klickstein, L. B., Brenner, M. B., and Lee, D. M. (2005). Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. *J Immunol*, **174(6)**, 3668.

[Weber et al., 2001] Weber, K., Weber, C., Ostermann, G., Dierks, H., Nagerl, W., and Kolanus, W. (2001). Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr Biol*, **11(24)**, 1969.

[Weber et al., 1999] Weber, K. S., Draude, G., Erl, W., de Martin, R., and Weber, C. (1999). Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of $I\kappa B-\alpha$. *Blood*, **93(11)**, 3685.

[Wollenberg and Bieber, 1998] Wollenberg, A. and Bieber, T. (1998). Two populations of CD1a⁺ epidermal dendritic cells expressing B7 molecules in human skin. *Br J Dermatol*, **138(2)**, 358.

[Wollenberg et al., 1996] Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of epidermal Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic cell (IDEC)

- population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol*, **106(3)**, 446.
- [Wollenberg et al., 1999] Wollenberg, A., Wen, S., and Bieber, T. (1999). Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical application of a flow cytometric micromethod. *Cytometry*, **37(2)**, 147.
- [Wright et al., 1990] Wright, M. D., Henkle, K. J., and Mitchell, G. F. (1990). An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumour-associated antigen. *J Immunol*, **144(8)**, 3195.
- [Wright et al., 2004] Wright, M. D., Moseley, G. W., and van Spriël, A. B. (2004). Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens*, **64(5)**, 533.
- [Wrone-Smith and Nickoloff, 1996] Wrone-Smith, T. and Nickoloff, B. J. (1996). Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest*, **98(8)**, 1878.
- [Wucherpfennig, 2001] Wucherpfennig, K. W. (2001). Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest*, **108(8)**, 1097.
- [Yang et al., 2005] Yang, L., Froio, R. M., Sciuto, T. E., Dvorak, A. M., Alon, R., and Luscinskas, F. W. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α activated vascular endothelium under flow. *Blood*, **106(2)**, 584.
- [Yang et al., 2002] Yang, X., Claas, C., Kraeft, S. K., Chen, L. B., Wang, Z., Kreidberg, J. A., and Hemler, M. E. (2002). Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell*, **13(3)**, 767.
- [Zhang et al., 2002] Zhang, X. A., Kazarov, A. R., Yang, X., Bontrager, A. L., Stipp, C. S., and Hemler, M. E. (2002). Function of the tetraspanin CD151- $\alpha 6\beta 1$ integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **13(1)**, 1.

L

LITERATURVERZEICHNIS

Lebenslauf

Personalien

| | |
|---------------------|-----------------------|
| Vor- und Zuname | Julia Jessica Jockers |
| Geburtsdatum | 06.03.1978 |
| Geburtsort | Berlin |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulischer und beruflicher Werdegang

| | |
|-------------------|---|
| 1984 – 1988 | Grundschule in Berlin-Wedding |
| 1988 – 1990 | Grundschule in Berlin-Wilmersdorf |
| 1990 – 1997 | Hildegard-Wegscheider-Oberschule in Berlin-Wilmersdorf |
| 09/1997 – 07/2002 | Studium: Angewandte Naturwissenschaft an der TU Bergakademie Freiberg |

Thema der Diplomarbeit:

Auswirkungen des Metallaustauschs auf die katalytischen Eigenschaften der Muconat-Cycloisomerase von *Pseudomonas putida*
PRS 2000

| | |
|-------------------|---|
| 07/2002 | Abschluß als Diplom-Naturwissenschaftler; Gesamtnote im Diplom: 1,3 |
| 08/2002 – 12/2002 | wissenschaftliche Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie an der TU Bergakademie Freiberg |
| seit 05/2003 | wissenschaftliche Mitarbeit in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Bonn in der Gruppe von Professor Dr. med. Dr. es. sci. T. Bieber unter Leitung von Frau PD. Dr. med. N. Novak |

Danksagung

Ich danke allen Spendern, nicht nur weil ich durch das Blut eine Arbeitsgrundlage erhielt, sondern auch für die vielen Gespräche, die mir insbesondere das Krankheitsbild der Psoriasis vulgaris näher brachten. Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, die mich die zwei Jahre in verschiedenster Art und Weise unterstützten, angefangen von der Entnahme von Blut bis hin zu aufbauenden Worten, wenn ein Versuch mal nicht klappte oder ein Patient kein Blut spenden wollte.

Ich möchte mich bei Frau PD Dr. med. N. Novak für die Bereitstellung des Themas bedanken und die Unterstützung, sowie die Möglichkeit an wissenschaftlichen Tagungen teilnehmen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus möchte ich für die Unterstützung und anregenden Gespräche in den letzten zwei Jahren danken.

Auch den beiden Arbeitsgruppen, die mich offen aufnahmen und ein angenehmes Arbeitsklima schafften, bin ich zu Dank verpflichtet. Die offenen Gespräche und die dummen Fragen, die ich stellen durfte, ohne gleich ausgelacht zu werden, werde ich vermissen.

Insbesondere danke ich Dr. Uwe Reimer, der für die letzten Monate nach Bonn zog, und Dr. Susanne Koch. Beide haben diese Arbeit im Endspurt maßgeblich beeinflusst.

Ich danke Bettina, Tine, Ela und Holger, dass sie im Labor immer für mich da waren und jedes noch so kleine Problem mit mir diskutiert haben, bis es sich in Wohlwollen aufgelöst hatte.

Ich möchte auch meiner Familie danken, dass sie mich die ganze Zeit unterstützt hat und sich immer wieder die selben Themen anhörte.

Thomas Baltus danke ich für die tatkräftige Unterstützung zu frühesten Stunden bei den Migrationsversuchen in Aachen.

Schließlich danke ich allen Freunden und weiteren Kooperationspartnern, die mich in den letzten zwei Jahren begleiteten und dem Leben die nötige Würze verliehen.