

Aus dem Zentrum der
Dermatologie und Venerologie
des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Roland Kaufmann

Bedeutung bakterieller Superantigene und der T-Zell Rezirkulation
in die Haut für das Hautimmunsystem

Habilitationsschrift
für das Fach Dermatologie und Venerologie

dem Fachbereich Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

HABILITIERT

AM 02.01.2001

Dr. med. Thomas M. Zollner

Frankfurt am Main

2000

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Untersuchungen sind in folgenden Publikationen bzw. zur Publikation eingereichten Arbeiten enthalten:

Boehncke WH, Dressel D, Manfras B, Zollner TM, Wettstein A, Bohm BO, Sterry W. T-cell-receptor repertoire in chronic plaque-stage psoriasis is restricted and lacks enrichment of superantigen-associated V beta regions. J Invest Dermatol 1995;104:725-728.

Zollner TM, Munk ME, Keller T, Nuber V, Boehncke WH, Kaufmann SH, Duijvestijn AM, Sterry W, Kaufmann R. The superantigen exfoliative toxin induces cutaneous lymphocyte-associated antigen expression in peripheral human T lymphocytes. Immunol Lett 1996;49:111-116.

Boehncke WH, Dressel D, Zollner TM, Kaufmann R. Pulling the trigger on psoriasis. Nature 1996;379:777.

Zollner TM, Nuber V, Duijvestijn AM, Boehncke WH, Kaufmann R. Superantigens but not mitogens are capable of inducing upregulation of E-selectin ligands on human T lymphocytes. Exp Dermatol 1997;6:161-166.

Boehncke WH, Zollner TM, Dressel D, Kaufmann R. Induction of psoriasiform inflammation by a bacterial superantigen in the SCID-hu xenogeneic transplantation model. J Cutan Pathol. 1997;24:1-7.

Zollner TM, Neubert C, Wettstein A, Boehncke WH, Manfras B, Bohm BO, Sterry W. The T-cell receptor Vbeta repertoire of nickel-specific T cells. Arch Dermatol Res 1998;290:397-401.

Zollner TM, Kaufmann R. Superantigens in T cell mediated skin diseases--more than a coincidence! J Invest Dermatol. 1999;112:118-119.

Boehncke WH, Zollner TM. The role of bacterial superantigens in pathophysiology of the skin. Hautarzt 1999;50:91-97.

Boehncke WH, Zollner TM. Die Rolle bakterieller Superantigene für die Pathogenese der Psoriasis. In: Plettenberg A, Meigel WN, Moll I: Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. S. 176 – S. 179. Springer Verlag, Berlin, 2000.

Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, vonMallinckrodt C, Wagner TOF, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2000, im Druck.

Müller-Alouf H, Proft T, Zollner TM, Gerlach D, Champagne E, Desreumaux P, Geoffroy-Fauvet C, Fitting C, Cavaillon JM, Alouf JE. Comparative Immunological and Cytokine Inducing Properties of a Novel Superantigen (SMEZ) and Pyrogenic Exotoxin A of *Streptococcus pyogenes*. Eingereicht.

Zollner TM, Podda M, Beschmann HA, Duijvestijn AM, Ludwig R, Kaufmann R, von Andrian UH. Expression and function of skin-homing receptor cutaneous lymphocyte-associated antigen and α 1,3-fucosyltransferase VII mRNA are suppressed by NF- κ B inhibitors. Eingereicht.

Podda M, Ludwig R, Esko JR, Kaufmann R, Zollner TM. Glycoside-based primers inhibit expression and function of the cutaneous lymphocyte-associated antigen by T-cells via inhibition of oligosaccharide side chain elongation. Eingereicht.

Zollner TM, Podda M, Beschmann HA, Ludwig R, Weber C, von Andrian UH, Kaufmann R. Cyclosporine A and FK506 inhibit the expression and function of the cutaneous lymphocyte-associated antigen CLA on T-cells via α (1,3)-fucosyltransferase VII. Eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Das Hautimmunsystem	1
1.1.1 Der Begriff „Hautimmunsystem“	1
1.1.2 Die Keratinozyten als Initiatoren der kutanen Entzündung	2
1.1.3 Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen des Hautimmunsystems	6
1.1.4 Antigen-spezifische Amplifikation der kutanen Entzündung durch T-Zellen	11
1.2 T-Zell-Migration im Hautimmunsystem	14
1.2.1 Bedeutung der Kompartimentierung des Immunsystems für die Immunüberwachung	14
1.2.2 Die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen auf CD45RA+ und CD45RO+ Zellen beeinflusst das zelluläre Migrationsverhalten	17
1.2.3 Bindung von T-Zellen an Endothelien: Modell einer vierstufigen Interaktion	19
1.2.4 Invasion von T-Zellen in die Haut	21
1.2.4.1 Das kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen CLA	21
1.2.4.2 CLA ist der zentrale Ligand des endothelialen Selectins CD62E	27
1.3 Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Zellpräparation und Zellkultivierung	31
2.1.1 PBMC	31
2.1.2 T-Lymphozyten	31
2.1.3 Epidermale Keratinozyten	32
2.1.4 Kultivierung der Zellen	32
2.1.5 Kokultur von frisch isolierten, humanen Keratinozyten mit autologen T-Zellen	32
2.2 Funktionelle Assays	33
2.2.1 T-Zell Proliferation	33
2.2.2 Statischer Selektinbindungsassay	34
2.2.3 Durchflußzytometrischer Selektinbindungsassay	34
2.2.4 Intravitalmikroskopie	35
2.3 Methoden zum Nachweis der DNA-Protein-Interaktion	35

	Seite	
2.4	Methoden zum Nachweis der mRNA Expression der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase-VII	36
2.5	Methoden zum Nachweis der TCR $V\alpha$ und $V\beta$ mRNA Expression	38
2.6	Methoden zum Nachweis der (Glyko-) Proteinexpression	38
2.6.1	Durchflußzytometrie	38
2.6.2	Immunhistochemie	40
2.7	Psoriasis-Induktion in der Severe Combined Immunodeficiency (SCID) Maus durch bakterielle Superantigene	40
2.7.1	Patienten und Patientenproben	40
2.7.2	Verwendete Mäuse und interventionelles Vorgehen	40
2.8	Klinische Untersuchungen zum Schweregrad der atopischen Dermatitis unter dem Einfluß bakterieller Superantigene	42
2.8.1	Probanden und Probandenproben	42
2.8.2	Einschluß- und Ausschlußkriterien	42
2.8.3	Isolation von <i>S. aureus</i> und Nachweis der von <i>S. aureus</i> produzierten Superantigene	43
2.9	Statistische Auswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Bakterielle Superantigene spielen eine bedeutende Rolle bei der Induktion von T-Zell medierten Hautkrankheiten	44
3.1.1	Induktion einer psoriasiformen Dermatitis durch ein bakterielles Superantigen in einem SCID-hu xenogenen Transplantationsmodell	44
3.1.2	Die Besiedelung mit Superantigen-produzierenden <i>Staphylococcus aureus</i> ist mit der Schwere der atopischen Dermatitis assoziiert	52
3.2	Molekulare Veränderungen des Hautimmunsystems durch Superantigene (I): T-Zell Rezeptor Repertoire	62
3.2.1	Präferentielle Verwendung von distinkten T-Zell Rezeptor $V\beta$ Regionen epidermotroper T-Zellen in der Psoriasis	62
3.2.2	Das T-Zell Rezeptor Repertoire der Haut bei chronisch-stationärer Psoriasis ist restringiert, zeigt aber keine Häufung von Superantigen-assoziierten $V\beta$ -Ketten	65
3.3	Molekulare Veränderungen des Hautimmunsystems durch Superantigene (II): Induktion des hautspezifischen Rezirkulationsmoleküls CLA	71

	Seite	
3.3.1	Das Superantigen Exfoliatives Toxin induziert die Expression des kutanen Lymphozyten-assoziierten Antigens auf peripheren humanen T-Zellen	71
3.3.2	Superantigen-, nicht jedoch Mitogen-Stimulation induziert selektiv die Expression von E-Selektin Liganden auf T-Zellen	77
3.3.3	MHC Klasse II+ Keratinozyten präsentieren Superantigene an T-Zellen und induzieren die Aufregulation von CLA	84
3.4	Modifikation der CLA-Expression auf transkriptioneller Ebene	91
3.4.1	Die Expression und Funktion des kutanen Lymphozyten-assoziierten Antigens CLA und $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII mRNA werden durch NF- κ B Inhibitoren supprimiert	91
3.4.2	FK506 und Cyclosporin A hemmen die CLA-Expression und Funktion	106
3.5	Modifikation der CLA-Expression und –Funktion durch Oligosaccharide auf posttranskriptioneller Ebene	112
4.	Zusammenfassung	118
5.	Literatur	124
6.	Abkürzungsverzeichnis	157

1. Einleitung

1.1 Das Hautimmunsystem

Die Haut ist das flächenmäßig größte Organ des menschlichen Körpers. Wie eine Hülle bedeckt sie den darunter befindlichen Organismus, um ihn vor Umwelteinflüssen zu schützen. Zu diesen potentiell schädlichen Einwirkungen zählen u.a. mechanische Belastungen, Mikroorganismen sowie eine Unzahl von körperfremden Substanzen, mit denen sich die Haut aufgrund ihrer anatomisch exponierten Position auseinandersetzen muß. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, muß sie neben einer hohen mechanischen Stabilität eine gute Regenerationsfähigkeit besitzen, pathogene Mikroorganismen und fremde, potentiell gefährliche Substanzen bereits am Eindringen hindern oder den Schaden durch penetrierte Organismen oder Substanzen minimieren. In all diese Aufgaben sind Zellen des Hautimmunsystems wesentlich involviert. Die aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation gute Zugänglichkeit des Hautorgans für wissenschaftliche Fragestellungen führte in den letzten Jahren zu einem enormen Fortschritt in unserem molekularen Verständnis immunologischer Vorgänge in der Haut. Im Folgenden sollen wesentliche Komponenten des Hautimmunsystems und deren Funktion erläutert werden.

1.1.1 Der Begriff „Hautimmunsystem“ („skin immune system“)

Der Begriff „Hautimmunsystem“ (skin immune system; SIS) wurde 1987 von J.D. Bos und M. Kapsenberg geprägt (Bos et al., 1987; Bos und Kapsenberg, 1993). Er beschreibt die Gesamtheit immunkompetenter Zellen sowie löslicher Faktoren, die an einer kutanen Immunantwort beteiligt und in der gesunden Haut vorhanden sind. Zu den zellulären Hauptdarstellern auf der Bühne des Hautimmunsystems zählen Keratinozyten, professionelle Antigen-präsentierende dendritische Zellen, T-Zellen und Endothelzellen (**Tabelle 1**). Da – im Gegensatz zum mukosalen Immunsystem des Magen-Darm-Trakts und

Tabelle 1: Zelluläre und humorale Komponenten des Hautimmunsystems (Auswahl)

Zellulär	Humoral
Keratinocyten	Zytokine
Dendritische Zellen	Immunglobuline
T-Zellen	Komplementkaskade
Endothelzellen	Neuropeptide

der Lunge – B-Zellen am Hautimmunsystem der gesunden Haut nicht beteiligt sind, wird das Konzept des Hautimmunsystems der älteren Beschreibung des „Haut-assoziierten lymphatischen Gewebes“ („skin-associated lymphoid tissue“, SALT; Streilein, 1978 und 1983) vorgezogen.

1.1.2 Die Keratinozyten als Initiatoren der kutanen Entzündung

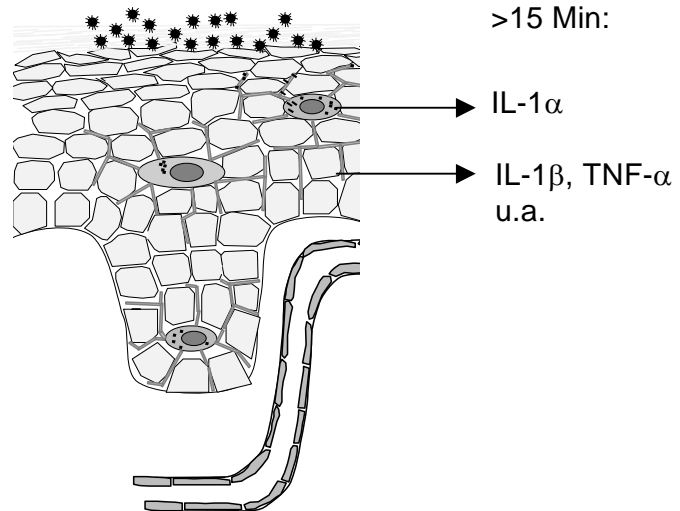
Während man früher z.T. von der Vorstellung ausging, daß Keratinozyten weitgehend passiv an immunologischen Vorgängen beteiligt sind, hat sich heute diese Vorstellung grundlegend gewandelt. Man weiß nunmehr, daß Keratinozyten durch den Kontakt mit Substanzen aus der Umwelt direkt aktiviert werden und innerhalb kürzester Zeit eine ganze Kaskade von Zytokinen freisetzen können. Die molekularen Mechanismen dieser Keratinozytenaktivierung sind z.T. unklar. Man weiß jedoch, daß einige Schwermetalle, Irritantien, UV-Licht sowie Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte wie Superantigene und Lipopolysaccharide die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B induzieren, wie dies für Keratinozyten (Corsini et al., 1997; Simon et al., 1994; Schmidt et al., 1996), Endothelzellen (Goebeler et al., 1995) sowie andere Zellpopulationen gezeigt wurde (Baeuerle und Henkel, 1994; Barnes und Karin, 1997). NF- κ B reguliert die transkriptionelle Aktivität einer Vielzahl proinflammatorischer Moleküle, zu denen zahlreiche Zytokin- und Adhäsionsmolekülgene zählen (Baeuerle und Henkel, 1994; Barnes und Karin, 1997) (Tabelle 2). Jedoch scheint nach epikutaner Applikation von Irritantien und Kontaktallergen nicht exakt das

gleiche Zytokinprofil von Keratinozyten produziert zu werden. So kommt es zwar bei beiden Stimuli zur Produktion von TNF- α und GM-CSF durch Keratinozyten (sowie von IFN γ durch rasch einwandernde T-Zellen). Jedoch wurde IL-1 α , IFN-induziertes Protein 10 (IP-10) sowie Makrophagen inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) nur nach Allergen-Kontakt produziert (Enk und Katz., 1992a und 1992b). Die von Keratinozyten produzierten Zytokine und deren Funktion sind in **Tabelle 2** zusammengefaßt. Inwiefern dieses unterschiedliche Zytokinmuster allerdings von funktioneller Bedeutung ist, bleibt derzeit unklar. So kommt es v.a. durch Zytokine aus Keratinozyten in der Früh- und Spätphase nach Applikation von Allergenen oder Irritantien zu gleichartigen Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen und des Entzündungszellinfiltrates (Sterry et al., 1991; Brasch et al., 1992; Friedmann et al., 1993): Endothelzellen exprimieren bereits nach 2h vermehrt E-Selektin und VCAM-1 bzw. nach 8h ICAM-1. Außerdem nimmt die Zahl der Langerhans Zellen in der Epidermis auf beide Stimuli bereits nach 2h ab mit einem simultanem Anstieg in der Dermis. Schließlich ist die HLA-DR Aufregulation auf Keratinozyten bei beiden Substanzklassen ebenso identisch wie das T-zelluläre Infiltrat. Somit scheinen Keratinozyten trotz gewisser molekular nachweisbarer Differenzen zwischen Allergenen und Irritantien Signale aus der Umwelt uniform in proinflammatorische Stimuli umzuwandeln, die sich primär in der Zytokinfreisetzung äußert. Dieser folgt zum einen die Auswanderung und spätere Reifung von Langerhans Zellen (s.u.) und die Aufregulation verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Endothelien. Als drittes Ereignis bedingt durch die Aktivierung der Keratinozyten folgt der Aufregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle die Invasion eines Entzündungszellinfiltrates, welches im Rahmen der Immunüberwachung zur Inspektion sämtlicher den Organismus penetrierender Substanzen erforderlich ist (**Abb. 1**).

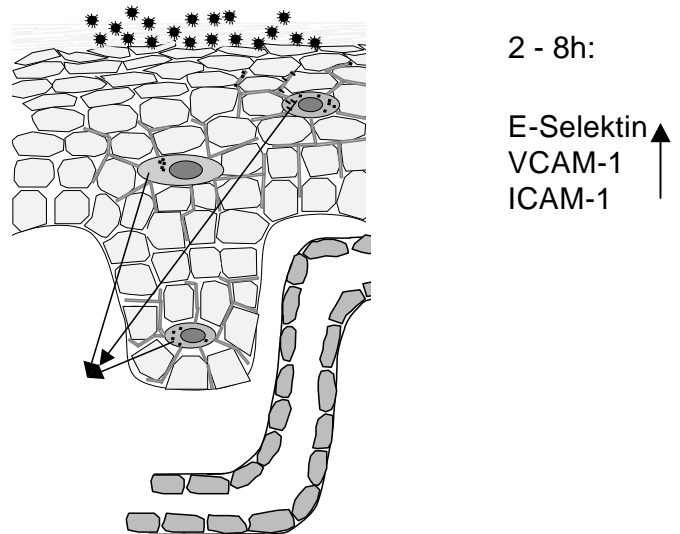
**Tabelle 2: Funktion der von Keratinozyten produzierten Zytokine
(Auswahl)**

Zytokin	Abkürzung	Funktion (Auswahl)
Interleukin 1 alpha Interleukin 1 beta	IL-1 α IL-1 β	Stimulation von T- und B-Zellen Förderung der Migration und Reifung von Langerhans Zellen Induktion der Freisetzung sekundärer proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-6, IL-8) Induktion von Adhäsionsmolekülen Stimulation der Keratinozytenproliferation
Interleukin 6	IL-6	B-Zell Stimulation und Antikörperproduktion Induktion von Adhäsionsmolekülen (u.a. ICAM-1, E-Selektin, VCAM-1)??? Stimulation der Keratinozytenproliferation
Interleukin 7	IL-7	Förderung T-Zell Proliferation (IL-2 mediiert)
Interleukin 8	IL-8	Chemotaktisch für Neutrophile, Basophile und T-Zellen
Interleukin 10	IL-10	Hemmung der Langerhans Zell Th1 Aktivierung
Interleukin 12	IL-12	Erleichterung der IFN γ Freisetzung
Interleukin 18	IL-18	Erleichterung der IFN γ Freisetzung
Tumor Nekrose Faktor-alpha	TNF- α	Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten Induktion von Adhäsionsmolekülen Induktion der Langerhans-Zell Viabilität und Reifung Verstärkung der IL-1, IL-6, IL-8 Produktion
Transformierender Wachstumsfaktor beta	TGF- β	Immunsuppressiv durch Hemmung der Langerhans Zell-mediierten T-Zell Aktivierung
Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor	GM-CSF	Langerhans Zell Reifung und Migration Stimulation von Neutrophilen und Makrophagen Stimulation der Keratinozytenproliferation
Plättchen-derivierter Wachstumsfaktor	PDGF	Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen Induktion der Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese
Proopiomelanokortin	POMC	Immunsuppressiv
alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon	α -MSH	Immunsuppressiv

I: Antigenkontakt



II: Auswanderung der Langerhans Zellen und Aufregulation von Adhäsionsmolekülen



III: Leukozyteninfiltration

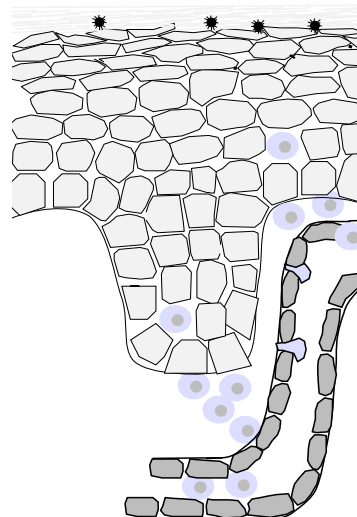


Abb. 1 Keratinozyten übertragen Umweltreize in proinflammatorische Signale. (* : Antigen, Antigenpartikel und prozessierte Antigene)

Neben der Induktion eines proinflammatorischen Milieus sorgen die Keratinozyten jedoch gleichzeitig für Schadensbegrenzung. So produzieren aktivierte Keratinozyten auch IL-10. IL-10 behandelte Langerhans Zellen sind nicht in der Lage, die Proliferation von Th1 Zellen zu induzieren und führen zu einer klonalen Anergie dieser Zellen (Enk und Katz, 1992; Enk et al., 1993; Peguet-Navarro et al., 1994). Weitere immunsuppressiv wirkende Mediatoren, die von Keratinozyten produziert werden, sind TGF β , Pro-Opiomelanokortin und α -MSH.

Die Hauptaufgabe der Keratinozyten besteht zusammenfassend in der Signalvermittlung zwischen Außenwelt und Immunsystem durch die Etablierung eines proinflammatorischen Milieus, das die Induktion von Adhäsionsmolekülen und dadurch letztlich die Rekrutierung des Entzündungszellinfiltrates zur Folge hat.

1.1.3 Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen des Hautimmunsystems

Steinman und Cohn beschrieben als erste eine aus der Milz isolierte Zellpopulation mit dendritischer Morphologie, die bei der Maus ausgeprägte Antigen-präsentierende Eigenschaften aufwies (Steinman und Cohn, 1973). Man unterscheidet heute drei verschiedene Arten von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, die alle für das Hautimmunsystem von Bedeutung sind: Epitheliale dendritische (z.B. Langerhans Zellen), lymphoide dendritische (z.B. dendritische Zellen des Paracortex) und gewebsständige dendritische Zellen (z.B. dermale dendritische Zellen; Austyn, 1987).

(1) Paul Langerhans beschrieb bereits als Medizinstudent im Jahr 1868 eine Zelle mit dendritischer Morphologie, die mit der Cohnheim Goldchloridtechnik darstellbar und suprabasal lokalisiert ist (Langerhans, 1868). Sie enthält elektronenmikroskopisch darstellbare, tennisschlägerartig geformte sog. Birbeck-Granula (Birbeck et al., 1961), ist Fc-, C3-Rezeptor und HLA-Klasse II positiv (Stingl et al., 1977; Klareskog et al.,

1977; Stingl et al., 1978) und entstammt dem Knochenmark (Frélinger et al., 1979; Katz et al., 1979). Für die Immunüberwachung ist sie von eminenter Bedeutung, da sie die Haut konfrontierende Antigene aufnimmt, prozessiert und über die Lymphgefäße in die parakortikale Region des Lymphknotens einwandert (Macatonia et al., 1987, Kripke et al., 1990). Weiterhin wird von Langerhans Zellen bereits 15 Min. nach Kontakt mit einem Allergen, nicht jedoch mit einem Irritans, IL-1 α produziert (Enk und Katz, 1992a und 1992b, 1995). Ob diese in Gegenwart von Allergenen präferentielle IL-1 α Produktion für die Induktion einer Kontaktallergie jedoch tatsächlich von Bedeutung ist, bleibt derzeit unklar. Während die epidermale Langerhans Zelle hervorragende Antigen-prozessierende Eigenschaften hat, ist ihre Fähigkeit zur Aktivierung von ruhenden T-Zellen noch nicht voll ausgereift (Schuler und Steinman, 1985; Heufler et al., 1988; Stossel et al., 1990; Kämpgen et al., 1991; Weinlich et al., 1998).

- (2) Bei ihrer Auswanderung aus der Haut in den Lymphknoten verändert die Langerhans Zelle ihr Aussehen, ihre immunphänotypischen Eigenschaften und ihre Funktionen. Aufgrund ihrer veränderten Lokalisation und Eigenschaften wird sie nun zu den lymphoiden dendritischen Zellen gezählt. Die Auswanderung der Langerhans Zelle aus der Haut wird durch verschiedene Zytokine reguliert. TNF- α spielt hierbei eine zentrale Rolle: So verursacht die Applikation von rekombinantem, murinem TNF- α eine rasche und dosisabhängige Auswanderung von Langerhans Zellen aus der Mauhaut in drainierende Lymphknoten (Kimber und Cumberbatch, 1992; Takayama et al., 1999). Hierfür scheint der p75 TNF- α Rezeptor verantwortlich zu sein, da ausschließlich in p75-defizienten, nicht jedoch in p55-defizienten Mäusen die Langerhans Zell-Migration reduziert ist (Wang et al., 1997). Auch die IL-4 induzierte Hemmung der Langerhans Zell-Migration wird durch die Downregulation des p75 TNF- α Rezeptors erklärt (Takayama et al., 1999). GM-CSF stimuliert wie TNF- α die Langerhans Zell-Migration (Takayama et al., 1999), wohingegen IL-10 diese inhibiert (Wang et al., 1999). Somit wirken die Th2 Zytokine IL-4 und IL-10 der Langerhans Zell-Migration entgegen, wohingegen die Zytokine TNF- α und GM-CSF, die sowohl von Th1 und Th2 Zellen produziert werden, diese induzieren. Für die

Migration aus der Epidermis scheint weiterhin die funktionelle Expression des Integrins VLA-6 erforderlich zu sein, da der VLA-6 neutralisierende Antikörper GoH3 die transepidermale Migration um bis zu 70% reduziert (Aiba et al., 1993; Price et al., 1997). Widersprüchlich ist, inwiefern Kontaktallergene und Irritantien unterschiedliche Einflüsse auf die Langerhans Zell-Migration ausüben: So fanden Sterry und Mitarbeiter ein stereotypes Migrationsmuster bei positiven und negativen epikutanen Testreaktionen, wohingegen die Gruppe um Schuler eine differentielle Migration nachweisen konnte (Sterry et al., 1991; Weinlich et al., 1998). Die Migration der Langerhans Zelle aus der Epidermis in den Lymphknoten geht mit einer Maturation und funktionellen Veränderung einher: Während in der Epidermis die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen essentiell ist, ist im Lymphknoten die optimale Aktivierung von T-Zellen erforderlich. Dazu sind mindestens drei distinkte Interaktionen erforderlich (Schuler, 1993) **(Abb. 2)**: (I) Ein enger Kontakt zwischen Langerhans Zellen und T-Zellen, der u.a. durch Antigen-unabhängige Kontaktmechanismen initiiert wird. Die molekulare Natur dieser Interaktion ist noch unklar, könnte aber evtl. durch die Interaktion des Chemokins MDC mit seinem Liganden auf T-Zellen CCR4 zurückzuführen sein (Inaba et al., 1989; Ross et al., 1999). Ein Kofaktor in der Initiierung dieser Zell-Zell Kontakte könnte evtl. von dendritischen Zellen produziertes IL-16 sein, das u.a. auf T-Zellen chemotaktisch wirkt (Kaser et al., 1999). (II) Diese Antigen-unspezifische Zell-Zell Interaktion ermöglicht die Interaktion des Peptid – MHC Komplexes einerseits mit dem T-Zell Rezeptor andererseits. Eine hohe Dichte an MHC Klasse II Molekülen sowie eine stabile Expression des zu präsentierenden Antigens optimiert das Priming von naiven T-Zellen mit dem jeweiligen Antigen. Eine effiziente Antigen-Präsentation wird durch eine initial hohe Syntheserate von Klasse II Molekülen erreicht, die mit der Reifung der Zellen nahezu komplett sistiert. Auch der Turnover der Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche kommt mit der Maturation nahezu vollständig zum Erliegen. Weiterhin geht die Synthese der invarianten Kette bei reifen dendritischen Zellen nach anfänglich starker Produktion dramatisch zurück, wohingegen der Turnover hoch bleibt (Kämpgen et al., 1991). (III) Für eine erfolgreiche T-Zellstimulation ist schließlich die Expression

kostimulatorischer Moleküle erforderlich. So exprimieren dendritische Zellen im Rahmen des Reifungsprozesses hohe Mengen des CTLA4 (CD28)-Rezeptors B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), wofür GM-CSF wesentlich verantwortlich ist (Larsen et al., 1994). Für die Reifung der Langerhans Zellen in hocheffiziente T-Zell stimulierende lymphoide dendritische Zellen sind v.a. GM-CSF und IL-1 verantwortlich (Witmer-Pack et al., 1987; Heufler et al., 1988). Auch IFN γ , das bereits 1 – 2h nach epikutanem Kontakt mit Fremdsubstanzen durch einwandernde T-Zellen produziert wird (Enk und Katz, 1992a) scheint einen positiven Effekt auf die T-Zell stimulierende Kapazität zu haben (Peguet-Navarro et al., 1993). TNF- α erhöht bei frisch isolierten, murinen Langerhans Zellen lediglich die Lebensfähigkeit, nicht jedoch deren Funktionalität (Koch et al., 1990), während bei dendritischen Zellen, die mittels GM-CSF und IL-4 Kultivierung aus humanen PBMC gewonnen werden, die T-Zell stimulierende Kapazität zunimmt (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Die Zytokine GM-CSF, IL-1 und IFN γ sowie evt. TNF- α induzieren somit die Proliferation von naiven T-Zellen in Anwesenheit von dendritischen Zellen, wohingegen das Th2 Zytokin IL-10 diese inhibiert (Caux et al., 1994; Beissert et al., 1995). Wie unter 1.1.3 ausgeführt werden alle Zytokine, die für die Migration und Maturation von Langerhans Zellen erforderlich sind, von Keratinozyten in ausreichender Konzentration produziert werden, was deren Bedeutung für Wanderungsprozesse in vivo unterstreicht.

- (3) Dermale dendritische Zellen sind die gewebständigen dendritischen Zellen in der Einteilung nach Austyn (Austyn, 1987). Sie besitzen ebenfalls T-Zell stimulierende Fähigkeiten und können Langerhans Zellen bei der Induktion einer Kontaktdermatitis bei der Maus ersetzen (Streilein, 1989).

Die Hauptaufgabe der dendritischen Zellen ist zusammenfassend die Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen im Paracortex des Haut-assoziierten Lymphknotens.

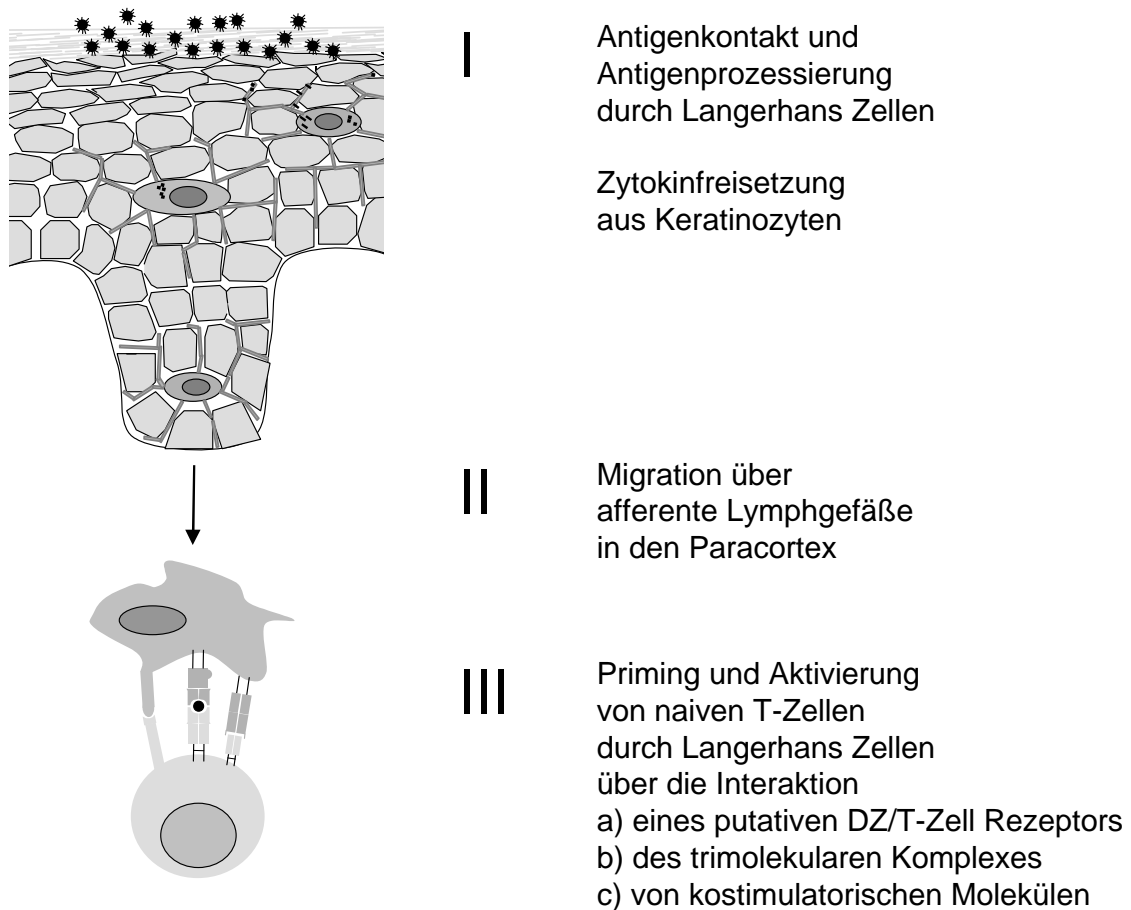


Abb. 2 Induktion der Sensibilisierung naiver T-Zellen durch dendritische Zellen. Nach Antigenkontakt der Haut Aufnahme des Antigens durch die Langerhans Zelle sowie Freisetzung von Zytokinen durch Keratinozyten. Dies induziert die Migration und Maturation von Langerhans Zellen. Im Paracortex des Haut-assoziierten Lymphknotens treffen maturierte, Antigen-beladene dendritische Zellen auf naive T-Zellen und bewirken eine Antigen-spezifische T-Zell Antwort.

1.1.4 T-Zellen: Antigen-spezifische Amplifikatoren der Entzündung

T-Lymphozyten befinden sich im Gegensatz zu B-Lymphozyten in gesunder und entzündeter Haut und sind in Epidermis und Dermis anzutreffen. Schätzungen zufolge sind ca. 4×10^9 T-Zellen in der gesunden Haut, was weniger als 1% aller T-Zellen entspricht (Bos et al., 1993; Alberts et al., 1994). 90% aller T-Zellen der gesunden Haut befinden sich in unmittelbarer Umgebung der postkapillären Venolen des papillären Gefäßplexus und der Hautanhangsgebilde. Während in der Epidermis v.a. CD8⁺ T-Zellen anzutreffen sind, kommen in der Dermis CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen etwa gleich häufig vor und exprimieren als Zeichen der Aktivierung meist HLA-DR sowie den IL-2 Rezeptor CD25 (Bos et al., 1987). Während perivaskuläre CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in das Hautorgan rezirkulieren, nimmt man an, daß die epidermalen CD8⁺ T-Zellen eher im Hautkompartiment resident sind.

Aufgrund von Rekonstitutionsexperimenten an bestrahlten Mäusen sowie von Experimenten an Nacktmäusen wissen wir, daß T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle bei der adaptiven Immunität spielen (Gowans und McGregor, 1965; Allison et al., 1974; Kindred, 1974; Ikuta et al., 1992). So sind CD8⁺ T-Zellen u.a. verantwortlich für Zerstörung von Virus-infizierten oder entarteten Zellen, wohingegen CD4⁺ T-Zellen entweder andere Zellarten (v.a. Makrophagen) über Zytokine aktivieren (Th1 Zellen) oder B-Zellen bei der Produktion von Immunglobulinen unterstützen. Für diese genannten Funktionen ist jedoch eine Aktivierung der naiven T-Zellen durch Zielzellen erforderlich. Im Falle von CD4⁺ Zellen erfolgt diese v.a. durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen im Lymphknoten (s. 1.1.3), wohingegen CD8⁺ Zellen durch Fremd- oder veränderte Peptide im Kontext von MHC Klasse I Molekülen direkt aktiviert werden können.

Am Beispiel der allergischen Kontaktdermatitis soll die Funktion von T-Zellen im Hautimmunsystem kurz dargestellt werden. Die epikutane Applikation von Kontaktallergenen (oder Irritantien) induziert eine Keratinozytenaktivierung und Freisetzung eines typischen Musters an Zytokinen, das u.a. die Reifung und Migration von Langerhans Zellen bewirkt. Antigen-beladene, MHC Klasse I und

II+, kostimulatorische Moleküle exprimierende Langerhans Zellen treffen im Lymphknoten auf eine große Anzahl naiver T-Zellen und können T-Zellen mit einem Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor sehr potent aktivieren („priming“). Aufgrund von Transferexperimenten ist bekannt, daß eine einzige bzw. sehr wenige Antigen-spezifische T-Zelle(n) ausreicht/ausreichen, um eine allergische Kontaktdermatitis auf ein naives Tier zu transferieren (Marchal et al., 1982; Bianchi et al., 1981). Diese enorme Potenz von T-Lymphozyten erklärt somit, warum die geringe Zahl von Antigen-spezifischen T-Zellen, die in Kontaktdermatitiden gefunden wird, für eine Entzündungsinduktion ausreichend ist (Kalish und Johnson, 1990). Andererseits stößt das Immunsystem damit auf ein logistisches Problem: In Anbetracht der geringen Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut (z.B. $< 1/10.000$ bzw. $< 1/100.000$ beim Beispiel der Urushiol-spezifischen Kontaktdermatitis bzw. Tetanustoxin; Kalish und Johnson, 1990; Cyster, 1999) und der Erfordernis der kontinuierlichen Immunüberwachung aller Organe ist es erforderlich, daß Antigen-spezifische T-Zellen schnell, effizient und möglichst spezifisch zu den Organen gelangen, in denen die Wahrscheinlichkeit am größten ist, auf das jeweilige Antigen erneut zu treffen. Durch eine Kompartimentierung der Antigen-spezifischen Immunantwort kann dieses logistische Problem vermindert werden: So konnte bei Patienten mit Nickelkontaktdermatitis gezeigt werden, daß die Nickel-spezifische T-Zellproliferation weitgehend auf Haut-assoziierte (CLA+) T-Zellen beschränkt ist (Santamaria Babi et al., 1995). Sensibilisierte T-Zellen werden somit im Lymphknoten nicht nur für ein spezifisches Antigen „geprimed“, sie erhalten zusätzlich noch die Information, in welchem anatomischen Kontext das Antigen erkannt wurde (Picker et al., 1993). Dies soll eine Rezirkulation in das jeweilige Organ veranlassen (s.u.). Diese wird durch eine rasche Aufregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen ermöglicht, die der Produktion von keratinozytären Zytokinen mit nur kurzer zeitlicher Verzögerung folgt (s.u.). Nach Sensibilisierung des Organismus führt dann jeder weitere Kontakt mit dem entsprechenden Antigen erneut zu einer Keratinozytenaktivierung gefolgt von einer raschen Aufregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die binnen weniger Stunden die Einwanderung eines Entzündungszellinfiltrates zur Folge hat. Die Einwanderung von spezifischen und unspezifischen T-Zellen verstärkt dann die Entzündungsreaktion. Dafür sind einerseits Antigen-

spezifische Mechanismen verantwortlich: Antigen-beladende dendritische Zellen oder Makrophagen präsentieren das Antigen in situ und aktivieren die Antigen-spezifischen T-Zellen (Nickoloff et al., 1995a). Andererseits führt die Interaktion von aktivierten Keratinozyten mit T-Zellen auch zu einer Antigen-unspezifischen Amplifikation der Entzündung. Diese erfolgt über T-Zell Zytokine (Boyera et al., 1993; Prinz et al., 1994), weiterhin kann die Interaktion von LFA-1 und CD28 auf T-Zellen mit ICAM-1 und Mitgliedern der B-7 Familie auf Keratinozyten die Proliferation ruhender Lymphozyten induzieren (Simon et al., 1991; Augustin et al., 1993; Nickoloff und Turka, 1994). Somit bewirken T-Zellen eine Amplifikation der Entzündungsreaktion, die in T-Zell depletierten Organismen vollständig ausbleibt (Pelleitier und Montplaisier, 1975). Weiterhin sind sie verantwortlich für unser immunologisches Gedächtnis. So führt der Kontakt einer naiven T-Zelle mit seinem Antigen zum einen – wie oben erwähnt – zur Aktivierung und Differenzierung in kurzlebige Effektorzellen. Darüber hinaus entstehen jedoch gleichzeitig sog. Gedächtnis-T-Zellen, die auch Jahre nach dem Erstkontakt mit einem Antigen für eine rasche Immunantwort sorgen können (Sprent, 1993).

Während die Bedeutung der T-Zellpopulation für Antigen-spezifische Immunreaktionen gut untersucht ist, ist die distinkte Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen z.T. noch unklar. Ursprünglich nahm man an, daß bei kontaktallergischen Reaktionen CD4+ T-Zellen die Effektorzellen sind und CD8+ T-Zellen regulatorische Funktion inne haben. Depletionsexperimente unter Verwendung monoklonaler anti-CD4 und anti-CD8 Antikörper bewiesen die Richtigkeit dieser Auffassung bei der sog. Expressionsphase der Kontaktallergie gegen 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB; Gocinski und Tigelaar, 1990). Wurde die jeweilige Population jedoch vor der Sensibilisierung depletiert, zeigte sich, daß CD4+ und CD8+ T-Zellen sowohl regulatorische als auch Effektorfunktionen besitzen können (Gocinski und Tigelaar, 1990). Diese Experimente wurden später bestätigt und durch den Nachweis eines unterschiedlichen Zytokinmusters bei Effektor CD8+ im Vergleich zu regulatorischen CD4+ T-Zellen erweitert. So produzierten die Effektor CD8+ T-Zellen ein sonst für Th1 Zellen typisches Zytokinmuster (v.a. IFN γ ; Romagnani, 1991) und wurden deshalb Tc1-Zellen genannt. Die regulatorischen CD4+ T-

Zellen produzierten die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10. Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung des gleichen Antigens mit MHC Klasse I bzw. Klasse II defizienten Mäusen bestätigt werden und scheinen auch für andere Antigene zuzutreffen (Bour et al., 1995; Lopez et al., 1998; Cavani et al., 1998).

T-Zellen haben somit entscheidende Aufgaben bei der Immunüberwachung, indem sie infizierte oder transformierte Zellen eliminieren, Makrophagen durch Zytokine aktivieren oder B-Zellen in der Produktion Antigen-spezifischer Immunglobuline unterstützen. Darüber hinaus sind sie – wie die B-Zellen – Träger des immunologischen Gedächtnisses und somit für eine effiziente Immunantwort nach langer Karenzzeit verantwortlich. Im Hautimmunsystem trägt die Interaktion von T-Zellen mit Keratinozyten bzw. von T-Zellen mit dendritischen Zellen wesentlich zur Amplifikation des Entzündungsprozesses bei.

1.2 T-Zell Migration im Hautimmunsystem

1.2.1 Die Bedeutung der Kompartimentierung des Immunsystems für die Immunüberwachung

Die Zellen des Immunsystems dienen der Elimination von fremden Antigenen und müssen dazu kontinuierlich sämtliche Organe des Organismus überwachen. Dazu ist es erforderlich, daß zirkulierende, immunkompetente Zellen aus dem Blut in verschiedene lymphatische Organe¹ einwandern bzw. rezirkulieren, was in zahlreichen Übersichtsarbeiten zusammengefaßt ist (Ford, 1975; Cahill et al., 1977; Hamann und Thiele, 1989; Picker und Butcher, 1992; Mackay und Imhof, 1993; Mackay, 1993; Springer, 1994).

¹ Im Folgenden sollen unter primären lymphatischen Geweben Knochenmark und Thymus verstanden werden; sie sind u.a. für die Produktion von Lymphozyten verantwortlich. Sekundäre lymphatische Organe sind Lymphknoten, Milz und das Magen-Darm-Trakt assoziierte lymphatische Gewebe, da diese – wie später ausgeführt – für eine optimale Akkumulation und Präsentation von Antigenen ausgerichtet sind. Als tertiäre lymphatische Organe werden die übrigen Organe bezeichnet, in denen sich unter physiologischen Umständen nur sehr wenige residente, lymphoide Zellen befinden, deren Zahl aber im Laufe eines entzündlichen Prozesses rapide zunehmen kann. Zu diesen zählt u.a. auch die Haut (Picker und Butcher, 1992).

In Anbetracht der nahezu unbegrenzten Zahl von Antigenen, mit denen sich der Organismus an verschiedenen anatomischen Regionen ständig auseinandersetzen muß, und der natürlicher Weise begrenzten Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen, ist eine Konzentration des Antigens in distinkten Organen erforderlich. Diese Aufgabe erfüllen die Lymphknoten. Antigene, die z.B. auf die Haut treffen, werden von Langerhans Zellen aufgenommen und in die der Haut zugeordneten Lymphknoten abtransportiert. Nur dort treffen sie auf eine immense Zahl von naiven (CD45 RA+) T-Zellen. Schätzungen zufolge wandern jede Sekunde ca. $1,4 \times 10^4$ Lymphozyten aus dem Blut in jeden einzelnen Lymphknoten (Cahill et al., 1976). Diese große Zahl an T-Zellen ist erforderlich, damit eine Antigen-präsentierende Zelle auf eine der wenigen Antigen-spezifischen T-Zellen stoßen und sie zur klonalen Proliferation aktivieren kann. Die klonale Proliferation ist zum einen für die Bereitstellung von aktivierten Effektor T-Zellen verantwortlich, zum anderen jedoch dient sie durch die Entstehung von langlebigen Gedächtnis (CD45RO+) T-Zellen der Etablierung des immunologischen Gedächtnisses.

Gedächtnis T-Zellen dienen direkt oder indirekt der unmittelbaren Elimination von Antigenen in den tertiären lymphatischen Organen, sobald sie erneut auf diese treffen. Da die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Antigenkontaktes in dem Organsystem am größten ist, in dem sie zuerst auf ihr spezifisches Antigen gestoßen sind, ist funktionell gesehen auch für diese T-Zell Gruppe – ebenso wie für die naiven T-Zellen – eine Extravasation in Organe nach rein zufälligen Gesichtspunkten ungünstig. Somit ist es sinnvoll, daß zusammen mit der Antigen-Spezifität im Lymphknoten eine Organspezifität imprimiert wird. Obwohl es bereits seit mehreren Jahrzehnten Hinweise für unterschiedliche Rezirkulationswege von immunkompetenten Zellen gibt, hat das molekulare Verständnis dieser unterschiedlichen Migrationsmuster erst in den letzten Jahren dramatisch zugenommen. Es sollen hier einige experimentelle Evidenzen, die das oben geschilderte Konzept belegen, dargestellt werden.

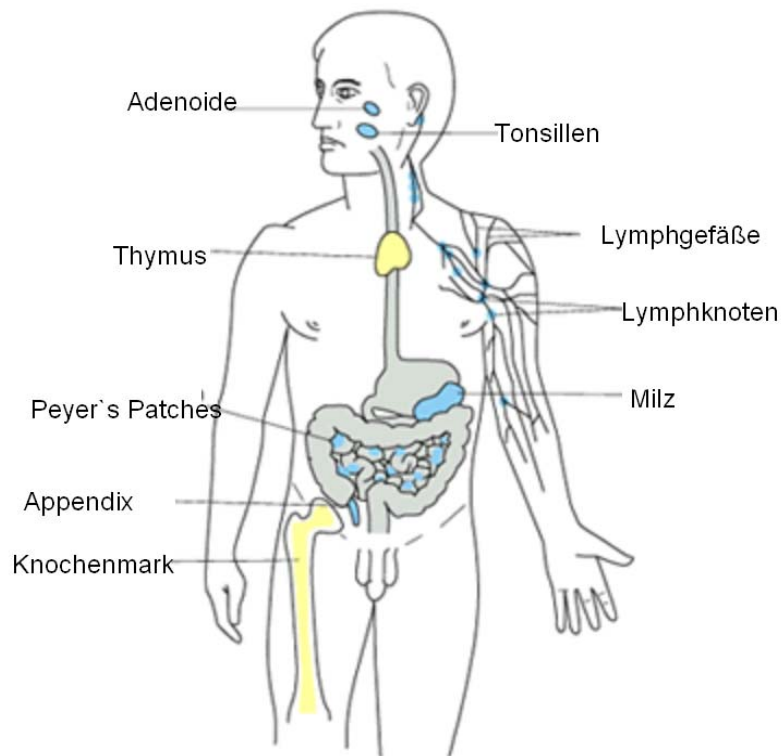


Abb. 3: Die lymphatischen Organe des Menschen, modifiziert nach Alberts et al., 1994).

Bereits 1965 untersuchten Hall und Morris das Wanderungsverhalten von ex vivo markierten und reinjezierten Leukozyten. Sie fanden, daß die überwiegende Zahl der Leukozyten in Lymphknoten einwandern, nach etwa 20h diese über die efferente Lymphe wieder verlassen und in das periphere Blut zurückkehren. Darüber hinaus wandert jedoch ein kleiner Teil in periphere Organe und erreicht die Lymphknoten über afferente Lymphgefäße (Hall und Morris, 1965). Ex vivo stimulierte und markierte T-Zellen wandern nicht in die Lymphknoten ein, sondern in tertiäre lymphatische Organe wie z.B. die Haut (Hall et al., 1972; Sprent, 1976). Während die unmittelbar den Lymphknoten infiltrierenden T-Zellen phänotypisch den naiven T-Zellen zugerechnet werden können, sind diejenigen, die die Lymphknoten über afferente Lymphbahnen erreichen und somit direkt in Gewebe eingewandert sind, phänotypisch Gedächtnis T-Zellen (Mackay et al., 1990). So konnte auch für die Haut nachgewiesen werden, daß die T-Zellen der Haut in Epidermis und Dermis den CD45RO Marker exprimieren (Bos et al., 1987; Foster et al., 1990), was nicht auf eine in situ Reifung der T-Zellen, sondern auf eine unterschiedliche

Einwanderung von naiven im Vergleich zu Gedächtnis T-Zellen zurückzuführen ist (Sterry et al., 1990).

1.2.2 Die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen auf CD45RA+ und CD45RO+ Zellen beeinflusst das zelluläre Migrationsverhalten

Während naive T-Zellen somit präferentiell in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten, Milz und Tonsillen und nicht in tertiäre lymphatische Gewebe einwandern, können Gedächtnis T-Zellen diese nicht nur infiltrieren; sie zeigen auch anatomisch bevorzugte Lokalisationen, die sie immer wieder aufsuchen und dorthin „rezirkulieren“. Ursächlich für dieses unterschiedliche Wanderungsverhalten ist eine differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen auf naiven im Vergleich zu Gedächtnis T-Zellen.

So kommt es im Verlaufe der Umwandlung von sog. naiven T-Lymphozyten zu Gedächtnis T-Lymphozyten zu einer starken Veränderung des Immunphänotyps dieser Zellen. Während naive T-Zellen, charakterisiert durch CD45RA-Expression, homogen geringe Mengen der Adhäsionsmoleküle CD2, CD11a, CD44 und CD49d exprimieren, werden diese Moleküle auf Gedächtnis T-Zellen, charakterisiert durch die Expression von CD45RO, stark exprimiert (Mackay CR et al., 1990; Picker et al., 1990a). Andere Adhäsionsmoleküle wiederum werden von CD45RO+ Zellen heterogen exprimiert. Zu diesen zählt L-Selektin, das auf naiven T-Zellen generell nachweisbar ist, wohingegen es Untergruppen von CD45RO+ Zellen gibt, die für dieses Antigen positiv oder negativ sind (Picker et al., 1993a). Weitere Antigene fehlen bei naiven T-Zellen (nahezu) komplett und sind erst nach Antigen-Stimulation nachweisbar. Zu diesen zählen u.a. das kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen (CLA) und das Integrin alpha4/beta7. Während nahezu alle T-Zellen der Haut das erstgenannte Antigen exprimieren, ist das Integrin alpha4/beta7 auf T-Zellen des Magen-Darm-Trakts präferentiell exprimiert (Picker et al., 1990b; Schweighoffer et al., 1993; Hamann et al., 1994) (**Tabelle 3**). Die differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen wird für das unterschiedliche

Bindungsverhalten von naiven im Vergleich zu Gedächtnis T-Zellen an Endothelien verantwortlich gemacht.

Während in adulten Organismen annähernd ausschließlich CD45RO+ T-Zellen in tertiäre Lymphorgane wie z.B. die Haut auswandern, können in der Embryonalzeit sowie unmittelbar postpartal auch naive CD45RA+ T-Zellen in tertiäre lymphatische Organe auswandern (Alferink et al., 1998). Dies konnte insbesondere für naive, CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Da die Blockade der T-Zell Emigration in das Hautorgan zu einem Verlust der Toleranzinduktion führte, nimmt man an, daß die Migration von naiven T-Zellen essentiell für die Etablierung der Toleranzentwicklung gegenüber sessilen, organspezifischen Selbstantigenen ist (Alferink et al., 1998).

Tabelle 3: Differentiell exprimierte T-zelluläre Adhäsionsmoleküle (Auswahl)

NAME	SYNONYM	Familie	EXPRESSION	LIGAND(EN)	FUNKTION
L-Selektin	CD62L	Selektin	alle CD45RA+ , schwach auf Untergruppen von CD45RO+ (CD45RO+ CLA+ L-Selektin+)	evt. 6'-Sulfo-sLex auf endotheliale PNA _d (CD34, GlyCAM-1) bzw. MAdCAM-1	Rolling; Einwanderung naiver T-Zellen in Lymphknoten
CLA		Kohlenhydrat	CD45RO+ der Haut	E-Selektin	Rolling an Endothelien der Haut
ICAM-1	CD54	Ig-Superfamilie	schwach auf CD45RA+, stark auf CD45RO+ T-Zellen und aktivierten Endothelien	LFA-1	Organunspezifische feste Adhäsion
LFA-1	CD11a/CD18 αL/β2-Integrin	Integrin	CD45RA+ schwach, CD45RO+ stark; Aktivierungsepitop auf CD45RO+	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Organunspezifische starke Bindung
VLA-4	CD49d/CD29 α4/β1-Integrin	Integrin	CD45RA+ schwach, CD45RO+ stark; Aktivierungsepitop auf CD45RO+	VCAM-1, Fibronectin und α4β1	Rolling und Organunspezifische feste Adhäsion
LPAM-1	α4/β7-Integrin	Integrin	CD45RO+ T-Zellen des Magen-Darm-Trakts	MAdCAM-1, VCAM-1	Rolling und feste Adhäsion
Hyaluronsäure-rezeptor	CD44		schwach auf CD45RA+ , stark auf CD45RO+	Hyaluronsäure	(evt. Rolling und) Transmigration

1.2.3 Bindung von T-Zellen an Endothelien: Modell einer vierstufigen Interaktion

Während man ursprünglich annahm, daß für jedes Organ ein distinktes Adhäsionsmolekülpaar auf Endothelzellen bzw. T-Zellen für organspezifische Migrationsprozesse von Lymphozyten verantwortlich ist (Butcher, 1986; Springer, 1990), zeigte sich später die immense Komplexität des Systems der Interaktion zwischen Endothel und T-Zellen, so daß zunächst ein zwei Stufen umfassendes (von Andrian et al., 1991) und später ein vier Stufen umfassendes Modell der T-Zell – Endothelzell-Interaktion beschrieben wurde, welches heute allgemein akzeptiert ist (Shimizu et al., 1992; Springer, 1994; Dunon et al., 1996). Die Moleküle, die in die Interaktion von Leukozyten mit Endothelien involviert sind, gehören im Wesentlichen zu vier verschiedenen Genfamilien: *Selektine* und deren Liganden, *Chemokine* und Chemokinrezeptoren, *Integrine* und ihre Liganden, die zu der *Immunglobulin-Superfamilie* zählen (Übersichtsarbeiten: Fabbri et al., 1999; Seabrook et al., 1999; Baggiolini, 1998; Dunon et al., 1996; Ebnet et al., 1996; Springer, 1995; Girard und Springer, 1995;).

1. *Tethering und Rolling*: *Selektine* mediiern die Initiierung des Zellkontaktes von Leukozyten mit Endothelzellen. Das Andocken der Leukozyten an die Gefäßwand führt aufgrund der hohen Flußgeschwindigkeit des vorbeifließenden Blutstromes nicht zu einem sofortigen Stop der Zelle, sondern zunächst zum Abbremsen („Tethering“) und anschließendem „Rollen“ („rolling“) der Zellen an der Gefäßwand. Während der rasch an der Gefäßwand vorbeiströmende Anteil der Leukozytenpopulation keine Signale vom Endothel empfangen kann, kann das Migrationsverhalten der rollenden Zellen durch das Endothel beeinflusst werden. *Selektine* sind somit von zentraler Bedeutung für das Rollen von Lymphozyten am Endothel, gelegentlich kann dies jedoch auch durch die Ligandenpaare CD49d auf Lymphozyten mit VCAM-1 bzw. MAdCAM auf Endothelien vermittelt werden (Berlin et al., 1995).

2. *Triggering*: *Chemokine* werden von Proteoglykanen auf Endothelien an der luminalen Oberfläche der Gefäße an Leukozyten präsentiert (Tanaka et al., 1993; Middleton et al., 1997) und von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten erkannt. Aufgrund der Vielzahl von unterschiedlichen Chemokinen sind sie

ideale Kandidatenmoleküle, um zur Spezifität der Rezirkulation zu unterschiedlichen Organen beizutragen (Cyster, 1999). Darüber hinaus sind die Chemokinrezeptoren an G-Proteine gekoppelt, die innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Zellaktivierung („Triggering“) führen können.

3. *Firm Adhesion*: Die Chemokin-Chemokinrezeptor medierte Leukozytenaktivierung bewirkt eine Konformationsänderung von *Integrinen*, die eine Erhöhung ihrer Bindungseigenschaften zur Folge hat. Diese ist Voraussetzung, damit die initiale, schwache Bindung über Selektine und ihre Liganden verstärkt wird. Für diese feste Bindung sind auf Endothelzelleseite v.a. ICAM-1 und VCAM-1 (Mitglieder der *Immunglobulin-Superfamilie*) sowie auf Leukozytenseite die Integrine LFA-1, Mac-1, VLA-4 sowie das Intregin alpha4/beta7 verantwortlich.

4. *Transmigration*: Die feste Bindung ist Voraussetzung für die anschließende Transmigration von Leukozyten durch die Gefäßwand.

Die sequentielle Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten ist in **Abb. 4** schematisch dargestellt.

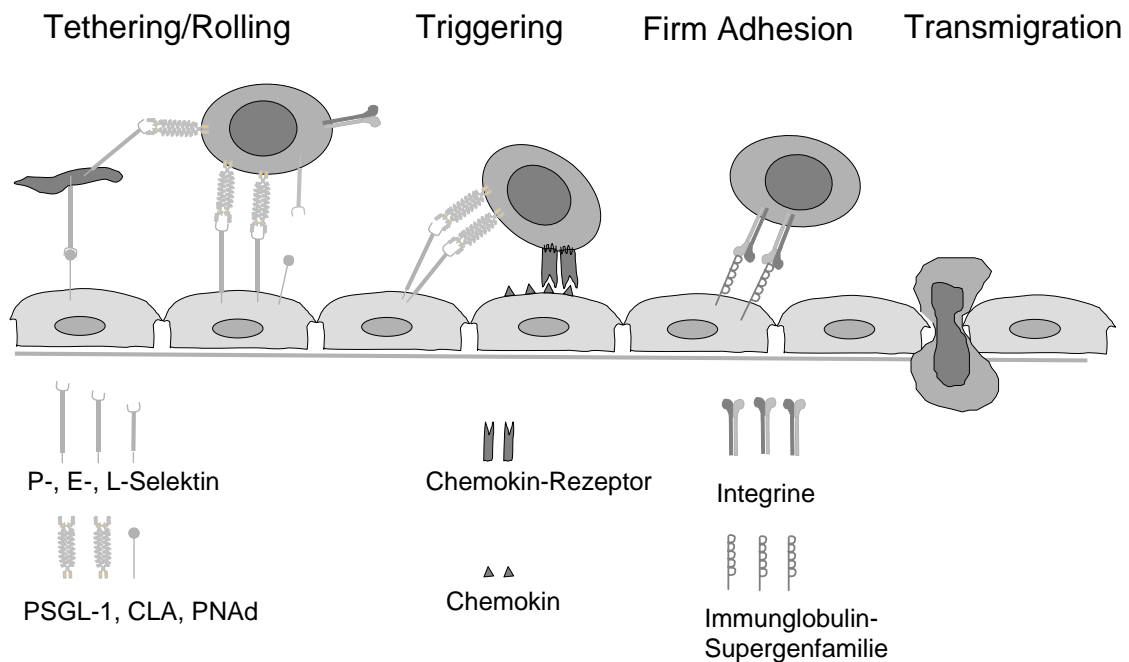


Abb. 4 Das Vier-Stufen-Modell der Lymphozytenextravasation.

1.2.4 Invasion von T-Zellen in die Haut

1.2.4.1 Das kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen CLA

Expression von CLA

Die Bedeutung des HECA-452 Antigens für T-Lymphozyten des Hautorgans wurde erstmals 1990 beschrieben (Picker et al., 1990a). Dieser Antikörper, der ursprünglich als spezifischer Marker für HEV publiziert wurde (Duijvestijn et al., 1988), erkennt ein ca. 200 kDa großes Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten exprimiert wird. Er ist vorwiegend bei Gedächtnis T-Zellen (CD45RO), nicht jedoch bei naiven T-Zellen (CD45RA) zu finden: Dementsprechend exprimieren HECA-452+ Zellen noch eine Reihe anderer Adhäsionsmoleküle, die vorwiegend auf Gedächtnis T-Zellen exprimiert werden, wie z.B. CD2, CD18, CD44 und CD58. T-Lymphozyten des Hautorgans sind HECA-452+, wohingegen Lymphozyten anderer Organe dieses Antigen nur sehr gering exprimieren (ca. 5%) (Picker et al., 1990a; Davis und Smoller, 1992; Picker et al., 1994). Dies trifft auch für primär kutane T-Zell Lymphome zu: In 89% der untersuchten Biopsien von Mycosis fungoides im Stadium I und II war die überwiegende Mehrzahl der infiltrierenden T-Zellen HECA-452+, wohingegen primär extrakutane T-Zell Lymphome überwiegend HECA-452-sind (Picker et al., 1990a; Noorduyn et al., 1992). Die präferentielle Expression des HECA-452 Antigens auf T-Zellen in der Haut, nicht jedoch in extrakutanen Geweben führte zur Prägung des Begriffes Kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen (CLA) (Picker et al., 1990b) in Abgrenzung zu T-Zellen, welche präferentiell den Magen-Darm-Trakt infiltrieren (mucosal lymphocyte-associated antigen; MLA; Picker et al., 1990b).

CLA+ T-Zellen finden sich nicht nur in der Haut im Vergleich zu extrakutanen Organen in größeren Mengen. Der Prozentsatz der CLA-Expression im peripheren Blut nach ex vivo-Analyse oder ex vivo-Kultivierung korreliert darüber hinaus auch mit dem Vorhandensein oder der Ausprägung einer Hauterkrankung. Dies konnte für kutane T-Zell Lymphome (Borowitz et al., 1993), Milch-induziertes Ekzem (Abernathy-Carver et al., 1995) und bei einer Gruppe von Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen werden (Zollner et al., 2000). Darüber hinaus fanden Santamaria Babi et al., daß die

Nickelsulfat-spezifische T-Zell Proliferation bei Patienten mit Nickelkontaktdermatitis bzw. die Hausstaubmilben-spezifische Proliferation bei Patienten mit atopischer Dermatitis und Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben auf die CLA-exprimierende T-Zell Population beschränkt war (Santamaria Babi et al., 1995). Die Korrelation der CLA-Expression mit der Ausprägung von Krankheitssymptomen an der Haut legt nahe, daß die CLA-Expression somit speziell für Erkrankungen des Hautorgans verantwortlich ist.

Chemische Struktur

Während die Korrelation der CLA-Expression mit Erkrankungen des Hautorgans schon seit einigen Jahren gut dokumentiert ist, war die Struktur des vom HECA-452 Antikörper erkannten Epitops lange Zeit unklar. Berg et al. konnten nachweisen, daß Neuraminidase-Behandlung von CLA+ T-Zellen die Bindung des HECA-452 Antikörpers an diese Zellen verhindert, was eine zentrale Rolle von Sialinsäure für die Funktion von CLA impliziert (Berg et al., 1991a). Weiterhin bindet HECA-452 ein sialyl Lewis^x β1-3Gal Humanalbuminkonjugat, nicht jedoch Humanalbumin. Außerdem bindet es die isomere Form des Tetrasaccharids sialyl Lewis^x, nämlich sialyl Lewis^a (Berg et al., 1991b).

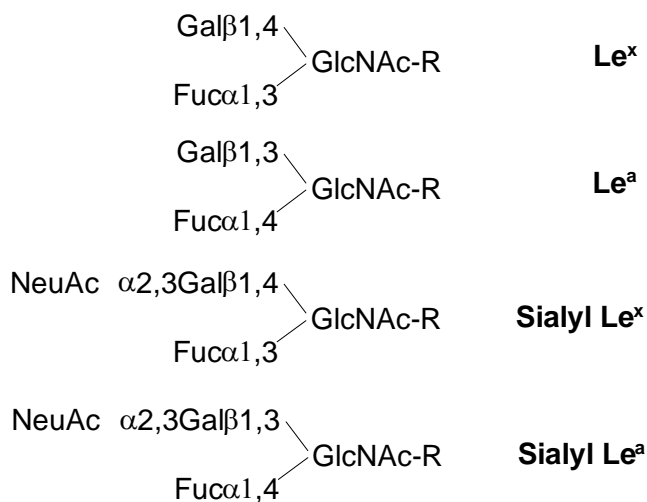


Abb. 5 Schematische Darstellung der O-verknüpften Oligosaccharide **Le^x, Le^a, sialyl Le^x und sialyl Le^a**.

CLA ist allerdings von sLe^x, das durch den monoklonalen Antikörper CSLEX1 erkannt und v.a. von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, verschieden. Zwar erkennt HECA-452 neben CLA auf T-Lymphozyten auch sLe^x auf Granulozyten und CSLEX1 auch CLA auf T-Zellen, letzteres jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz (Berg et al., 1991a). Somit erkennt HECA-452 ähnliche, jedoch nicht identische Kohlenhydratseitenketten wie der Antikörper CSLEX1. Damit vereinbar ist der Befund, daß auch sLe^x v.a. von T-Zellen der Haut, kaum jedoch von extrakutanen T-Zellen exprimiert wird (Paavonen und Renkonen, 1992; Munro et al., 1992).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von CLA mit sLe^x wird im Folgenden auf beide Moleküle eingegangen. Die Transfektion einer humanen Fucosyltransferase cDNA korreliert mit der de novo Expression von sLe^x und der Bindung an E-Selektin (Lowe et al., 1990). Dies konnte annähernd zeitgleich auch in der Maus unter Verwendung der murinen cDNA für eine $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase gezeigt werden (Goelz et al., 1990). Die funktionelle Bedeutung von sLe^x auf Granulozyten und einigen Tumorzell-Linien für die Bindung an E-Selektin konnte weiterhin durch die Blockade der Bindung an E-Selektin unter Verwendung des anti sLe^x spezifischen Antikörpers CSLEX1, durch Neuraminidase-Vorbehandlung der Zellen sowie unter Verwendung von sLe^x-haltigen Liposomen nachgewiesen werden, welche die E-Selektin Bindungsstellen und damit die Zell-Zell Interaktion blockierten (Phillips et al., 1990; Walz et al., 1990). CLA+ T-Zellen binden ähnlich wie sLe^x+ Granulozyten an E-Selektin auf Endothelien und dieses Selektin wird präferentiell, jedoch nicht ausschließlich, in chronisch entzündeter Haut im Vergleich zu anderen Organen exprimiert (Picker et al., 1991).

Während die Spezifität des HECA-452 Antikörpers für das Tetrasaccharid sLe^x bzw. nahe verwandter Strukturen schon seit einigen Jahren bekannt ist, konnten die Gruppen um T.S. Kupper und D. Vestweber den Proteinanteil dieses Antigens näher charakterisieren. So fanden beide Gruppen, daß CLA eine posttranslationale Modifikation des P-Selektin Liganden-1 (PSGL-1) darstellt (**Abb. 6**) und PSGL-1 der wesentliche Träger der HECA-452 Reaktivität ist (Fuhlbrigge et al., 1997; Borges et al., 1997).

PSGL-1 ist wahrscheinlich jedoch nicht der alleinige Proteinanteil von E-Selektin bindenden Oligosacchariden. So konnten Snapp et al. nachweisen,

daß K562 Zellen, die konstitutiv lediglich $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase (FucT)-IV, nicht jedoch FucT-VII oder PSGL-1 exprimieren, durch Transfektion alleine mit FucT-VII bereits an E-Selektin binden können (Snapp et al., 1997).

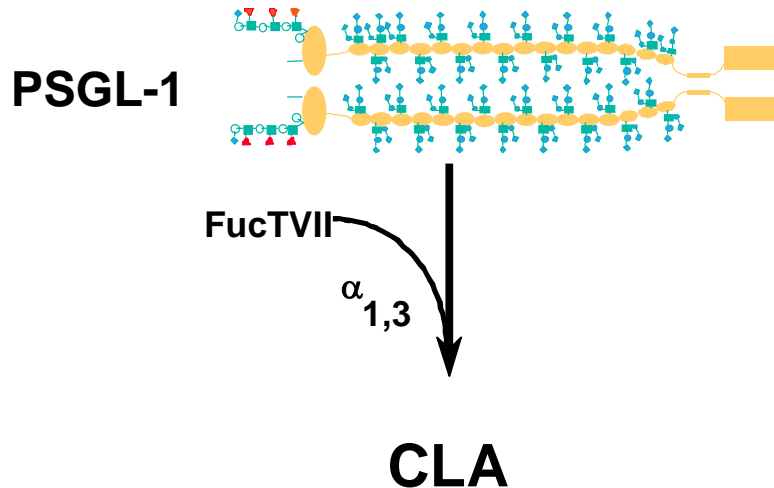


Abb. 6 Modifikation von PSGL-1 zu CLA durch die $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII

Für diese posttranslationale Modifikation ist die $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII verantwortlich (**Abb. 6**). Die Expression der FucT-VII, nicht jedoch von FucT-IV, korreliert mit der Bindung von B-Zellen an E-Selektin – unabhängig von einer evt. sLe^x bzw. CLA-Expression (Wagers et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten für andere Zell-Linien durch Transfektion von FucT-VII bestätigt werden: So führt die Transfektion mit FucT-VII, nicht jedoch mit FucT-IV, zur Expression des HECA-452 und CSLEX1 Epitops sowie zur Bindung an E-Selektin (Wagers et al., 1997). Die Bedeutung von FucT-VII für sLe^x-Expression und E-Selektin Bindung wurde auch bei FucT-VII defizienten Mäusen gezeigt: FucT-VII ^{-/-} Mäuse wiesen eine verminderte Bindung an E-Selektin auf, ebenso jedoch auch an P- und L-Selektin (Maly et al., 1996). Dieser FucT-VII Mangel resultiert somit in einer schweren Leukozytenadhäsionsdefizienz. Eine defiziente Expression von Selektin-Liganden – wie bei der FucT-VII ^{-/-} Maus – ist auch von klinischer Bedeutung: So wurden 1992 und 1999 insgesamt drei Patienten beschrieben, die einen Defekt in der Oberflächenexpression von fucosylierten Glykanen aufweisen, darunter auch das sialyl Lewis^x Antigen. Die

Fucosyltransferase-Aktivitäten sind jedoch im Normbereich. Der vermutete Defekt liegt in der Synthese von GDP-Fucose aus GDP-Mannose (Etzioni et al., 1992; Marquardt et al., 1999; Becker und Lowe, 1999).

In **Abb. 7** ist die Biosynthese von GDP-Fucose, das Substrat der Fucosyltransferasen, sowie in **Abb. 8** die Biosynthese von CLA bzw. sialyl Lewis^x schematisch dargestellt.

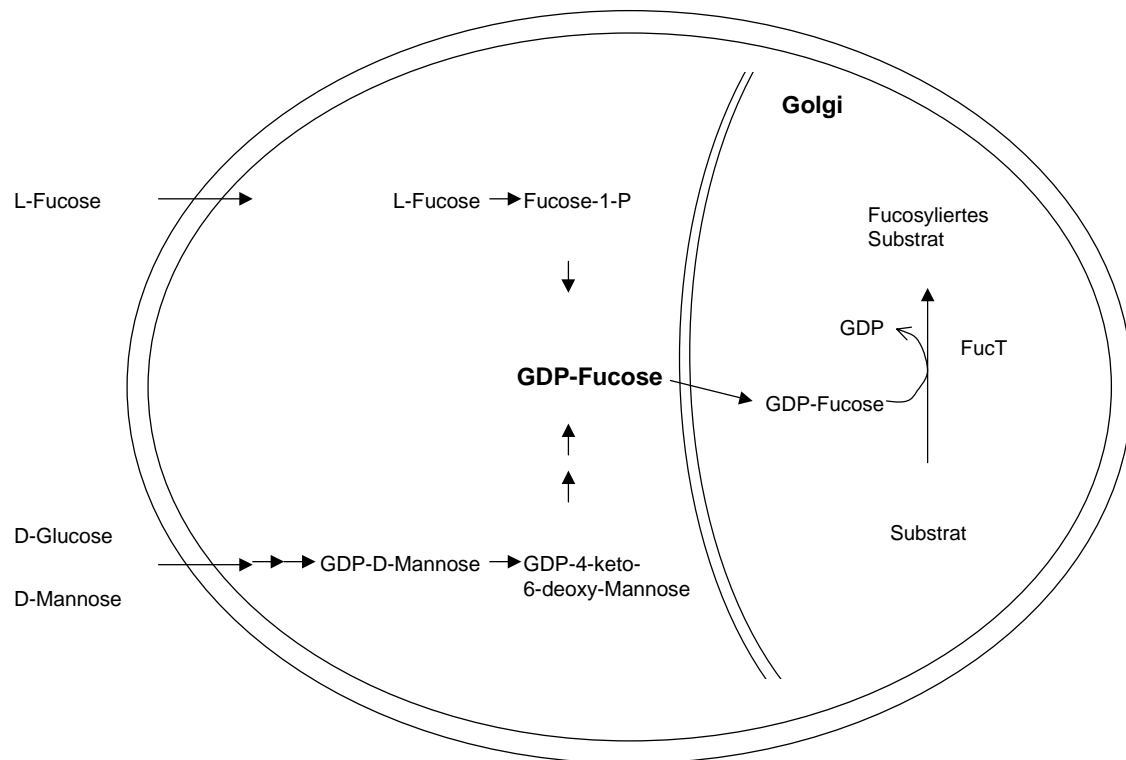


Abb. 7 Biosynthese von GDP-Fucose und Metabolisierung der GDP-Fucose durch Fucosyltransferasen im Golgi-Apparat.

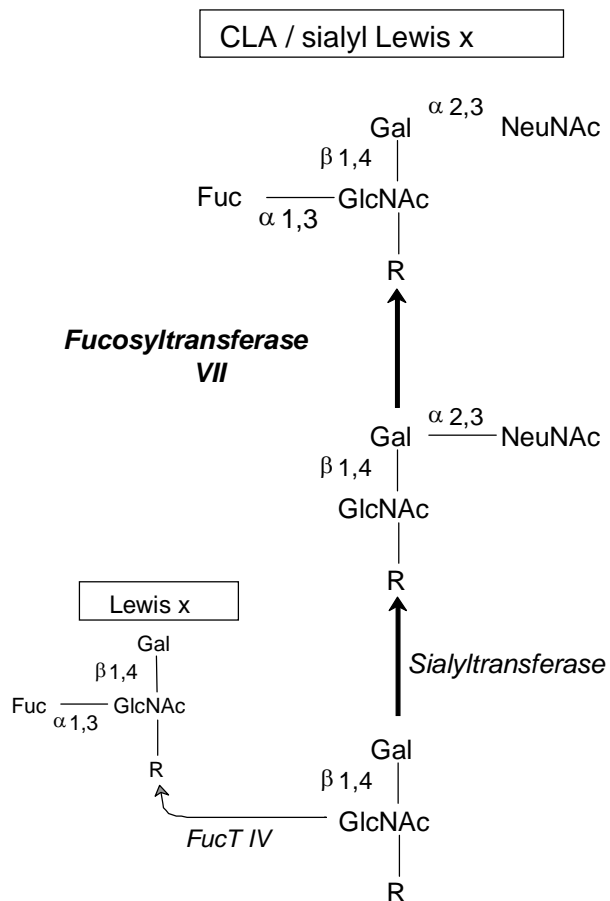


Abb. 8 Zentrale Rolle der $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII für die Biosynthese von CLA bzw. sialyl Lewis^x

Zusammenfassend wird das kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen vorwiegend von Gedächtnis T-Zellen der Haut exprimiert. Es besitzt eine zentrale Rolle für die Pathogenese T-Zell vermittelter Hauterkrankungen, da gezeigt werden konnte, daß die Zahl der CLA⁺ T-Zellen im Blut der Ausprägung von bestimmten Dermatosen korreliert bzw. die krankheitsauslösenden T-Zellen sich vorwiegend im Pool der CLA⁺ T-Zellen befinden. CLA ist nahe verwandt mit dem sialyl Lewis^x Antigen, das auf T-Zellen ebenfalls vorwiegend von T-Zellen der Haut exprimiert wird. Der Proteinanteil von CLA besteht vorwiegend aus PSGL-1. Für die Biosynthese von fucosylierten Glykoproteinen wie CLA und sLe^x sind neben Fucosyltransferasen (insbesondere die FucT-VII) auch ein unbeeinträchtigter GDP-Fucose Stoffwechsel erforderlich.

1.2.4.2 CLA ist der zentrale Ligand des endothelialen Selektins CD62E

Die erste Interaktion von Leukozyten im fließenden Medium mit Endothelzellen führt zu einem Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand. Die Vermittlung dieses Rollens an der Gefäßwand ist die zentrale Aufgabe von Selektinen (Kansas, 1996). Um diese Aufgabe zu erfüllen, ist eine spezielle molekulare Organisation der Selektine erforderlich, die es ihnen ermöglicht, ihre Bindungsstrukturen weit entfernt von der Endothelzellwand mit potentiellen Liganden in Kontakt zu bringen. Dies wird zum einen durch die Größe der Selektine selbst erreicht. Neben der eigentlichen Bindungsdomäne, der sog. Lectin-like domain, folgen nach den Epidermal growth factor repeats sog. complement binding (CB) elements. Hiervon gibt es bei dem längsten der Selektine, dem humanen P-Selektin, insgesamt neun, beim humanen E-Selektin sechs derartige Domänen. Eine schrittweise Entfernung dieser CB Elemente führt zu einer schrittweisen Verschlechterung des P-Selektin mediierten Rollings (Patel et al., 1995). Weiterhin erleichtert die exponierte Lage der Selektine auf den Mikrovilli den Kontakt mit den Liganden unter Flußbedingungen (von Andrian et al., 1995).

E-Selektin ist, wie P- und L-Selektin, ebenso in die Induktion des Leukozytenrolling involviert. E-Selektin wird in HUVEC durch proinflammatorische Stimuli wie IL-1 β und TNF- α rasch aufreguliert, erreicht binnen 4-6 h ein Maximum und fällt nach weiteren 12h wieder ab. Der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B ist von zentraler Bedeutung für die Aufregulation von E-Selektin auf Endothelzellen (Montgomery et al., 1991). In vivo ist E-Selektin in zahlreichen Organen bei chronischer Entzündung nicht nur kurzfristig, sondern dauerhaft exprimiert, darüber hinaus wird es präferentiell bei chronischer Entzündung der Haut im Vergleich zu anderen Organen exprimiert (Picker et al., 1991; Leung et al., 1991). Es ist für die Einwanderung sowohl von Neutrophilen und T-Lymphozyten in einem humanisierten SCID-Maus Modell verantwortlich (Silber et al., 1994; Yan et al., 1994). Jedoch ist die E-Selektin Expression auf Endothelien für CLA+ T-Zellen alleine nicht ausreichend, um in E-Selektin exprimierendes Gewebe außerhalb der Haut auszuwandern (Picker et al., 1994). Als für die Extravasation potentiell erforderliche, weitere Adhäsionsmolekülpaare kommen P-Selektin auf Endothelien und PSGL-1 auf

T-Zellen sowie L-Selektin auf Haut-infiltrierenden T-Zellen und PNAd auf Endothelzellen in Frage. So konnte gezeigt werden, daß neben E-Selektin Liganden auch die Expression von P-Selektin Liganden für die Auswanderung von T-Zellen in die Haut erforderlich ist (Tietz et al., 1998). Dementsprechend mediierten E- und P-Selektin die Rekrutierung von Th1-Zellen in die entzündete Mauhaut, wie durch die Blockade der Einwanderung mit funktionsblockierenden Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Astrup et al., 1997). Die Bedeutung des anderen, oben genannten Adhäsionsmolekülpaars unterstreicht die Ko-Expression von L-Selektin auf CLA⁺ CD45RO⁺ T-Zellen (Picker et al., 1990b). Während L-Selektin auf CD45RO⁺ T-Zellen meist im Rahmen des Aktivierungsprozesses durch Proteasen abgedaut wird, wird dies offensichtlich bei Haut-infiltrierenden Lymphozyten unterdrückt. Darüber hinaus wird der Ligand für L-Selektin, PNAd, nicht nur auf Endothelien des Lymphknotens, sondern auch in der Haut exprimiert (Arvilommi et al., 1996; Lechleitner et al., 1999).

E-Selektin ist der wesentliche Ligand des Haut-assoziierten Rezirkulationsmoleküls CLA auf T-Zellen (Picker et al., 1991; Berg et al., 1991a und 1991b; Rossiter et al., 1994). Es ist zusammenfassend somit das zentrale vaskuläre Adressin für die Einwanderung von T-Zellen in die Haut.

Neben der Interaktion von CLA bzw. sLe^x mit E-Selektin wurde von einigen Gruppen die Interaktion von PSGL-1 mit E-Selektin dokumentiert (Goetz et al., 1997; Borges et al., 1997): PSGL-1 besetzte Mikrosphären banden an E- und P-Selektin exprimierende CHO-Zell Linien. Für diese Interaktion waren zum einen Positionen innerhalb der ersten 19 Aminosäuren von PSGL-1 verantwortlich. So ist die Position 16 mit dem Tetrasaccharid sLe^x modifiziert. Weitere Bindungsstellen für E-Selektin sollen sich weiter „innen“ in Richtung des C-terminalen Endes von PSGL-1 befinden (Goetz et al., 1997). Für die Bindung von PSGL-1 an E-Selektin sind bestimmte posttranslationale Modifikationen des Moleküls erforderlich, die von Li et al. definiert wurden (Li et al., 1996). So erfordert die Bindung von PSGL-1 an E-Selektin die Expression von „core 2 O-linked“ Glykanen und somit die Expression des Enzyms core 2 β 1-6-N-Acetylglucosaminyltransferase (C2GnT). Diese O-verknüpften Glykane müssen adäquat sialyliert und fukosyliert sein. Die Sulfatierung von Tyrosinresten ist nur für die Bindung an P-, nicht jedoch an E-Selektin

erforderlich (Li et al., 1996). Somit widerspricht der Nachweis der PSGL-1 Bindung an E-Selektin keineswegs der zentralen Rolle von CLA bzw. sLe^x für die Bindung an E-Selektin und die Einwanderung von T-Lymphozyten in die Haut.

CLA und das nahe verwandte sLe^x binden an E-Selektin (CD62E) und sind im Konzert mit der Bindung von PSGL-1 an endotheliales P-Selektin für das Tethering und Rolling am Endothel verantwortlich. Da ohne diese initialen Bindungen die weiteren Schritte in der T-Zell Endothelzell Interaktion nicht ablaufen können, sind diese essentiell für die Extravasation von T-Zellen in die Haut. Eine Modifikation der Selektin – Selektin-Ligand Interaktion erscheint somit von wesentlichem therapeutischem Interesse.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung molekularer Mechanismen, die in die Induktion von T-Zell medierten Dermatosen involviert sind. Nach Charakterisierung der verstärkten T-Zell Migration in die Haut als zentralem, pathogenetisch relevantem Aspekt bei der Induktion bzw. Exazerbation von T-Zell medierten Dermatosen untersuchten wir therapeutische Strategien zur Reduktion dieser potentiell pathogenen Migrationsprozesse. Beispielhaft wurden die häufigen sowie dermatologisch und volkswirtschaftlich bedeutenden Erkrankungen Psoriasis vulgaris und atopische Dermatitis ausgewählt. Bei beiden Erkrankungen ist eine zentrale Bedeutung von T-Zellen in der Pathogenese unbestritten. Desweiteren haben diese Erkrankungen gemeinsam, daß sie durch Infektionen mit grampositiven Erregern induziert oder exazerbiert werden können.

Ausgangspunkt des ersten Teils der Arbeit war somit die Fragestellung, inwiefern Superantigene als Stoffwechselprodukte von grampositiven Bakterien in die Pathogenese dieser T-Zell medierten Dermatosen involviert sind. Dabei kamen Untersuchungen am Menschen sowie ein von uns etabliertes xenogenes Transplantationsmodell zur Anwendung. Neben der Untersuchung der Bedeutung von Superantigenen fragten wir uns, welche Veränderungen des

Hautimmunsystems durch diese Agentien beobachtet werden können. Da Superantigene zu einer massiven T-Zell Rezeptor V β spezifischen T-Zell Stimulation führen, führten wir Untersuchungen zum T-Zell Rezeptor Repertoire und zur Expression von T-Zell Adhäsionsmolekülen durch, da diese aktivierungsabhängig reguliert werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnten wir eine zentrale Bedeutung von Superantigenen für T-Zell medierte Dermatosen herausstellen, die aufgrund der von uns erhobenen Befunde zumindest teilweise durch eine Induktion eines Haut-spezifischen Phänotyps auf T-Zellen durch Superantigene erklärt werden kann. Somit ist ein detailliertes Verständnis zur Regulation der Expression des Haut-spezifischen Rezirkulationsmoleküls CLA nicht nur pathophysiologisch, sondern auch therapeutisch von großem Interesse. Aufgrund der Beobachtung, daß die bisher bekannten Stimuli von CLA die Aktivierung von NF- κ B gemeinsam haben und außerdem NF- κ B Bindungsstellen im Promoter des für die CLA-Expression verantwortlichen Gens FucT-VII beschrieben sind, fragten wir uns, inwiefern die CLA Expression und Funktion auf der Ebene von NF- κ B reguliert wird. Zudem wurde der Frage nachgegangen, ob Therapeutika, die derzeit u.a. bei der Psoriasis und der atopischen Dermatitis eingesetzt werden, auch eine Modifikation der CLA Expression und Funktion bewirken. Zuletzt untersuchten wir, inwiefern die CLA-Expression nicht nur auf transkriptioneller, sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflußt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Zellpräparation und Zellkultivierung

2.1.1 PBMC

Zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurde heparinisiertes Vollblut von freiwilligen Blutspendern oder Buffy Coats des Blutspendedienstes des Deutschen Roten Kreuzes, Frankfurt, verwendet. Die Zellen wurden auf Ficoll-Paque 1077 (Biochrom, Berlin) unter Verwendung von LeucoSep Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) geschichtet und für 20 Minuten mit 400g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMC wurden anschließend aus der sog. Interphase gewonnen und zweimal mit PBS (Gibco) gewaschen. Die Lymphozyten wurden anschließend entweder kultiviert oder für weitere Isolationsschritte verwendet.

2.1.2 T-Lymphozyten

T-Zellen wurden aus PBMC unter Verwendung des T-Zell Isolierungskits (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) durch Negativselektion entsprechend der Herstellerangaben gewonnen. Dabei werden PBMC ($120 \times 10^6/\text{ml}$) für 10 Minuten bei ca. 10°C mit einem kommerziell erhältlichen Cocktail von Hapten-konjugierten Antikörpern inkubiert ($20 \mu\text{l}$ Antikörper pro 10^7 Zellen), der an sämtliche Leukozytensubpopulationen mit Ausnahme der gewünschten T-Zellen bindet. Anschließend werden die markierten Zellen für 15 Minuten bei 10°C mit anti Hapten-konjugierten, paramagnetischen Microbeads inkubiert ($80 \mu\text{l}$ pro 10^7 Zellen), gewaschen und auf eine sich in einem Magnetfeld (Miltenyi Biotech) befindliche LS Magnetsäule (Miltenyi Biotech) pipettiert. Die markierten nicht T-Zellen werden durch die Beladung mit den paramagnetischen Microbeads in den Magnetsäulen zurückgehalten, wohingegen die immunologisch „unberührten“ T-Zellen eluiert werden. Diese werden durchflußzytometrisch auf ihre Reinheit überprüft und anschließend kultiviert. Die Reinheit der isolierten T-Zellen war stets $>95\%$.

2.1.3 Epidermale Keratinozyten

Primäre epidermale Keratinozyten wurden von freiwilligen Probanden nach erfolgter Aufklärung von spindelförmigen Exzidaten der Oberarminnenseite gewonnen. Die Exzidate wurden mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, mit Dispase II (2 U/ml) über Nacht inkubiert und anschließend die Epidermis vorsichtig von der Dermis entfernt. Nach Gewinnung einer Einzelzellsuspension durch kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%) wurden die Zellen mit KGM-2 Medium (BioWhittaker, Taufkirchen) resuspendiert und in Plastikflaschen zur Expandierung ausgesät.

2.1.4 Kultivierung der Zellen

PBMC bzw. T-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ mit RPMI1640 (Gibco) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS; Gibco) oder mit AIM-V Medium (Gibco) unter Zusatz von 5% FCS inkubiert. Weiterhin wurde den Medien Penicillin (100 U/ml; Biochrom) und Streptomycin (100 µg/ml; Biochrom) zugesetzt. Für Untersuchungen zur Regulation der CLA-Expression wurden PBMC für 0 – 10 Tage mit den bakteriellen Superantigenen exfoliatives Toxin (ET; 100 ng/ml) und toxischem Schocksyndrom Toxin-1 (TSST-1; 100 ng/ml; Toxin Technology, Sarasota, Florida, USA) inkubiert. Als Kontrollen wurden die Zellen entweder unstimuliert oder mit dem Mitogen PHA (1µg/ml; Biochrom) kultiviert. Hochgereinigte T-Zellen wurden mit einem Cocktail bestehend aus PHA (1µg/ml), IL-2 (100 U/ml; Chiron Therapeutics, Ratingen) und TGFβ (50 ng/ml; Strathmann Biotech, Hamburg) ebenfalls für 0 – 10 Tage inkubiert. Als Kontrollen wurden T-Zellen unstimuliert, nur mit PHA oder mit PHA und IL-2 kultiviert.

2.1.5 Kokultur von frisch isolierten, humanen Keratinozyten mit autologen T-Zellen

Epidermale Keratinozyten wurden wie oben erwähnt isoliert und für ca. 4 Wochen expandiert. Anschließend wurden von identischen Spendern T-Zellen wie oben erwähnt gewonnen und mit Keratinozyten kokultiviert. Dazu wurden Keratinozyten in

24-Napf Flachbodenplatten in KGM ausgesät und nicht adhärenente Zellen nach ca. 12 – 18h durch Mediumwechsel entfernt. Adhärenente Zellen wurden für 48h in An- oder Abwesenheit von IFN γ (1000 U/ml; R&D Systems, Wiesbaden) zur Induktion von Klasse II Molekülen inkubiert, Aliquots wurden zur durchflußzytometrischen Messung der HLA-DR, -DP und -DQ Expression entnommen. Die verbleibenden Keratinozyten wurden nach Mediumwechsel für 4 Tage mit T-Zellen (2×10^6 /ml) in An- oder Abwesenheit von bakteriellen Superantigenen koinkubiert. Kontrollansätze mit PHA als unspezifischem Mitogen wurden ebenfalls durchgeführt. Anschließend wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen in Superantigen-stimulierten Kokulturen im Vergleich zu unstimulierten Kulturen untersucht und der Effekt der IFN γ -Stimulation auf die Superantigen-präsentierenden Eigenschaften der Keratinozyten überprüft.

2.2 Funktionelle Assays

2.2.1 T-Zell Proliferation

PBMC bzw. T-Zellen (Endvolumen 200 μ l/Bohrloch, 2×10^5 Zellen/ml) wurden in RPMI1640 bzw. AIM-V Medium/5% FCS aufgenommen und in Dreifachansätzen in 96-Napf Flachbodenplatten (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Zellen wurden mit Superantigenen (Exfoliatives Toxin und TSST-1; Toxin Technology) in Konzentrationen von 100 pg/ml bis 10 μ g/ml stimuliert, darüberhinaus wurden Kontrollansätze in Abwesenheit von Stimulantien bzw. mit PHA (1 μ g/ml; Biochrom) durchgeführt. Die Kulturen wurden 4 Tage bei 37°C, 5% CO $_2$ inkubiert und anschließend nach Zugabe von 5 μ Ci 3 H-Thymidin (NEN, Life Science Products, Köln) für weitere 18h kultiviert. Der Einbau von 3 H-Thymidin in die DNA wurde in einem Betacounter Wallac 1409 (Wallac, Freiburg) nach Transfer der DNA auf Filterplatten (Nunc) mit Hilfe eines automatisierten Zellerntegerätes (Skatron Cell Harvester, Molecular Devices, Ismaning) gemessen.

2.2.2 Statischer Selektinbindungsassay

Lösliches E-Selektin- und P-Selektin-IgG Fusionsprotein wurde von R&D Systems (Wiesbaden) bzw. von PharMinGen (Hamburg) bezogen. Diese Moleküle bestehen aus den extrazellulären Anteilen von E- bzw. P-Selektin, die die Signalsequenz, die Lektin-artige Domäne, die Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Domäne und die Komplement-Domäne (CR-Domäne) beinhalten. Als Immunglobulinbestandteile besitzen sie die C_H2- und C_H3-Regionen der schweren Kette des Immunglobulins G. Der Bioassay zur Analyse der Selektin-medierten Bindung ist im Detail von Aruffo et al. beschrieben (Aruffo et al., 1991). ELISA-Platten wurden mit Ziege anti-human IgG Antikörpern beschichtet (10 µg/ml; Dianova, Hamburg), gewaschen, freie Bindungsstellen mit bovinem Serumalbumin (1 mg/ml) geblockt und anschließend wurden daran die rekombinanten Fusionsproteine (2 µg/ml) gebunden. Die zu untersuchenden, unterschiedlich vorbehandelten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH2 entsprechend der Herstellerangaben gefärbt, in 2 mM CaCl₂-haltigem PBS aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C in den vorbehandelten ELISA-Platten inkubiert. Die Platten wurden zweimal mit CaCl₂-haltigem PBS gewaschen und die Adhäsion mittels eines Fluoreszenz-ELISAs quantitativ bestimmt. Die unspezifische Zellbindung, gemessen unter Verwendung eines CD4-IgG Fusionsproteins, wurde abgezogen.

2.2.3 Durchflußzytometrischer Selektinbindungsassay

O.g. E- bzw. P-Selektinfusionsproteine (1 µg/Test) wurden über Nacht bei 4°C mit einem PE-konjugierten Ziege anti human IgG Antikörper (Verdünnung 1:100; Dianova, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen mit dem nun PE-markierten Fusionsprotein für 30 Minuten auf Eis gefärbt, eine Gegenfärbung wurde mit anti CD3-FITC (10 µl/Test; Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Zur Untersuchung der Spezifität der Färbung dienten Markierungen mit entsprechenden Isotypkontrollantikörpern. Die Messung der Selektinbindung erfolgte in Calcium- und Magnesium-enthaltendem PBS. Auf weitere Details zur Durchflußzytometrie wird in 2.6 eingegangen.

2.2.4 Intravitalmikroskopie

Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an eine von von Andrian beschriebene Methode mit entsprechender Modifikation zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Haut am Ohr (von Andrian, 1996). Adulte C57BL/6 Mäuse (Charles River Deutschland, Sulzfeld) wurden mit einem Gemisch aus Xylazin (10 mg/kg/KG) und Ketanest (100 mg/kg/KG) i.p. anästhesiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (nach ca. 10 - 20 Minuten) wurde dem Versuchstier ein Katheter in die rechte A. carotis implantiert. Die Einlage des Katheters erfolgte nach operativer Freilegung der Arterie unter mikroskopischer Sicht. Da der Katheter retrograd in die Arterie eingebracht wird, fließen die applizierten Zellen in den Aortenbogen und von dort u.a. in das Beobachtungsgebiet (linkes Ohr). Die Mäuse werden so plaziert, daß das linke Ohr zwischen einem Objektträger und Deckglas zu liegen kommen kann. Anschließend wurden BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein,acetoxymethylester; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) markierte T-Zellen retrograd injiziert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer Videokamera nachgewiesen und aufgezeichnet. Die Rollfraktion wird aus dem Prozentsatz derjenigen Zellen bestimmt, die mit dem Endothel interagieren und daran rollen bezogen auf die Gesamtzahl der markierten Zellen, die in dieser Zeit durch das beobachtete Gefäß strömten. Da die injizierten Zellen schnell aus der Zirkulation abgefangen werden, können unterschiedlich vorbehandelte Zellpopulationen nacheinander in das gleiche Versuchstier injiziert werden. Am Ende des Versuchs wurde den Versuchstieren 0,5 ml Anästhetikum appliziert und im Anschluß wurden sie durch zervikale Dislokation mit nachfolgendem Ausbluten getötet.

2.3 Methoden zum Nachweis der DNA-Protein-Interaktion

Gesamtzellextrakte aus 5×10^6 bis 1×10^7 pelletierten T-Zellen wurden in 50 – 100 µl eines Nonidet P-40/Igepal CA-630 (Sigma) enthaltenden Lysepuffer aufgenommen und 20 Minuten auf Eis inkubiert (Lysepuffer: 20 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 20% Glycerol, 1% Nonidet P-40/Igepal CA-630, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, supplementiert mit 20 µg/ml Aprotinin, 5 mM Dithiothreitol und 5 µl/ml

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF); Alle Reagenzien von Sigma). Zellfragmente wurden durch Zentrifugation vom Überstand entfernt. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde mit der Methode nach Bradford unter Zuhilfenahme des DC Protein Standard Assays (Bio-Rad, München) bestimmt. Die Bedingungen der DNA-Bindung sind im Detail von Schmidt et al. beschrieben (Schmidt et al., 1998). 10 µg Protein wurden für 15 Minuten mit 10.000 cpm ³²P-markierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden (Promega, Mannheim) in 20 µl Reaktionspuffer inkubiert (Reaktionspuffer: 20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 50 µM EDTA, 0.1% Nonidet P-40/Igepal CA-630, 1% Ficoll 400, 2% Glycerol, 0.1µl/ml PMSF, 20 mM Dithiothreitol, 1mg/ml bovines Serumalbumin, 100µg/ml poly(dI-dC). Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 1M EDTA gestoppt. Die Sequenz der Oligonukleotide war:

5´-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3´
3´-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5´

Für die Supershift Assays wurden Antikörper gegen die p50- oder p65-Untereinheiten von NF-κB (Biomol, Hamburg) den Bindungsreaktionen zugegeben. Die Proben wurden in einem nativen 4%igen Polyacrylamidgel in 0,5 fach konzentriertem TBE-Puffer für 2h bei 10 mV/cm aufgetrennt (TBE-Puffer: 90 mM TrisBase, 90 mM Borsäure, 20 mM Na₂-EDTA, pH 8.0). Die getrockneten Gele wurden bei -80°C über Nacht exponiert (Kodak XR Filme, Kodak, Stuttgart).

2.4 Methoden zum Nachweis der mRNA Expression der Fucosyltransferase-VII

Totale zelluläre RNA von 1x10⁷ Zellen wurde unter Verwendung von TRIzol entsprechend der Herstellerangaben (Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen) isoliert. Die RNA wurde in Nuclease-freiem Wasser (Promega) aufgelöst, die RNA Konzentration und Reinheit spektrophotometrisch über ihre optische Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg). Die reverse Transkription des Templates und die PCR wurden unter Verwendung des Access RT-PCR Systems, einem sog. "one tube, two enzyme system" durchgeführt (Promega). Dazu wurden 10 – 20 ng totale RNA in einem Endvolumen von 50 µl Reaktionspuffer aufgenommen (Reaktionspuffer: 0,75 mM MgSO₄, 1x konzentrierter Avian Myeloblastosis Virus (AMV) / *Thermus flavus* (Tfl-) Reaktionspuffer, 200 µM

der einzelnen dNTPs, 5 Einheiten AMV reverse Transkriptase und 5 Einheiten Tfl DNA Polymerase; Promega).

Sense und Antisense Primer wurden der RT-PCR in einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Die Sequenz des Fucosyltransferase-VII Vorwärtsprimers lautete:

5'-CAC CTC CGA GGC ATC TTC AAC TG-3',

die des Rückwärtsprimers

5'-CGT TGG TAT CGG CTC TCA TTC ATG-3' (MWG Biotech, Grafing).

Die RT-PCR Bedingungen waren im einzelnen: Reverse Transkription bei 48°C, 45 Minuten, gefolgt von der Inaktivierung der AMV Reversen Transkriptase bei 94°C, 2 Minuten. Amplifikation über 32 Zyklen: Denaturierung bei 94°C, 1 Minute, Annealing bei 70°C 1 Minute, Primerextension bei 69°C, 2 Minuten. Abschließend ein einzelner Zyklus bei 68°C über 5 Minuten. Die Amplifikation unter Verwendung der FucT-VII Primer resultierte in einem PCR-Produkt von 497bp. Zur Überprüfung, inwiefern gleiche Mengen Template bei den RT-PCR Reaktionen eingesetzt wurden, wurde als Kontrollgen der ADP Ribosylation Faktor 3 (ARF3) koamplifiziert. Dieser wird durch die Kulturbedingungen nicht reguliert und sollte bei allen verwendeten Proben im Agarosegel Banden gleicher Intensität ergeben. Die Sequenz des ARF3 Vorwärtsprimers lautete:

5'-CTT TGG AAA CCT TCT CAA GAG CC-3',

die des Rückwärtsprimers

5'-TAG TGT CTC CAG AGG GGT CGA ATC-3' (MWG Biotech).

Die ARF3-Primer wurden den RT-PCR Reaktionen in einer Endkonzentration von 0,75 μ M zugegeben, das Amplifikationsprodukt hatte eine Länge von 231 bp. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die amplifizierten FucT-VII Produkte wurden sequenziert und waren innerhalb des amplifizierten Anteils mit der publizierten FucT-VII Sequenz identisch (Sasaki et al., 1994). Um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, wurden Kontrollexperimente in Abwesenheit der AMV Reversen Transkriptase durchgeführt.

2.5 Methoden zum Nachweis der TCR V α und V β mRNA Expression

Für die TCR V α und V β Analyse der Haut und des peripheren Blutes wurden 0,5 g Biopsiematerial bzw. 2×10^6 PBMCs eingesetzt. Die Zellen wurden lysiert und die totale RNA wie oben beschrieben extrahiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels zufallsgenerierter („random“) Hexamere. Der Gehalt an TCR V α bzw TCR V β spezifischer cDNA wurde durch Koamplifikation einer Kontroll-DNA bestimmt (Manfras et al., 1997; Manfras et al., 1999). Dieser interne Standard besteht aus synthetischen DNA-Sequenzen, die die gesamten Primer-Bindungsstellen beinhalten, und ergibt ein Amplifikationsprodukt, das jeweils etwa 50 – 100 bp länger ist als die korrespondierenden TCR V α - oder V β -Amplifikate. Die V α - und V β -spezifischen Amplifikationen wurden unter Verwendung eines spezifischen C-Primers und 29 verschiedener V α -Primer (Genevee et al., 1992) bzw. 24 verschiedener V β -Primer (Hall und Finn, 1992) durchgeführt. Die Amplifikation des Erststranges von einer Menge von ca. 0,05 – 0,1 μ g totaler RNA wurde in 15 μ l Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,001% Gelatine) mit 5 U Taq-DNA Polymerase (Gibco), 2 pM der jeweiligen Primer, DNA-Standard und 200 μ M Deoxynukleotidtriphosphat durchgeführt. Die RT-PCR wurde über 30 Zyklen unter folgenden Konditionen durchgeführt: Denaturierung 94°C, 1 Min, Annealing 63°C, 1 Min, Primerextension 72°C, 2 Min. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.6 Methoden zum Nachweis der (Glyko-) Proteinexpression

2.6.1 Durchflußzytometrie

PBMC, T-Zellen oder Keratinozyten wurden nach den entsprechenden Kulturbedingungen aufgenommen, pelletiert und mit Hilfe der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz markiert. Im Falle der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit nicht-markierten Antikörpern für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erfolgte nach einmaligem Waschen die Markierung mit FITC- oder PE-konjugierten Sekundärantikörpern. Als Sekundärantikörper wurden ausschließlich F(ab)₂-Fragmente anstelle der kompletten Antikörper verwendet. Diese enthalten keinen Fc-Anteil und können somit nicht unspezifisch an CD16 (Fc-Rezeptor) binden,

was in einer deutlich verminderten Rate an falsch positiver Färbung resultiert. Die durchflußzytometrische Messung erfolgte nach einem weiteren Waschschrift. Im Falle der direkten Immunfluoreszenz wurden FITC-, PE- oder Streptavidin-Tricolour Red670-markierte Antikörper (Becton Dickinson) mit den zu untersuchenden Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, einmal gewaschen und anschließend gemessen. Meist wurde eine Vier-Parameter-Analyse, in einigen Fällen eine Fünf-Parameter-Analyse durchgeführt. Diese Parameter beinhalten die Größe als Vorwärtsstreulicht (FSC), die Granularität der Zellen als Seitwärtsstreulicht (SSC), die Fluoreszenz 1 (FITC), Fluoreszenz 2 (PE) sowie ggf. die Fluoreszenz 3 (Tricolour Red670). Falls mehr als eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt wurde, wurden die Zellen im Falle einer kombinierten indirekten und direkten Immunfluoreszenz zunächst mit der indirekten Methode markiert, gewaschen und anschließend mit der direkten Methode gegengefärbt. Im Falle von ausschließlich direkt konjugierten Antikörpern wurden diese meist simultan mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert und nach einem Waschschrift gemessen. Bei allen Messungen wurden stets irrelevante Kontrollantikörper des gleichen Isotyps zum Nachweis der Spezifität der Ergebnisse durchgeführt. Die Messungen wurden unter Verwendung eines FACScan bzw. des Nachfolgegerätes FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der Software Lysis II bzw. der Nachfolgesoftware CellQuest (Becton Dickinson) nach standardisierten Verfahren durchgeführt. Generell wurde ein Fenster (Gate) um lymphozytäre bzw. keratinozytäre Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gesetzt. Anschließend erfolgte die Darstellung in einem Histogramm (bei Einfachfluoreszenz) oder in einem Punktwolkendiagramm (bei Zweifachfluoreszenz), das sich ausschließlich auf die vorher in dem Fenster eingestellten Zellen bezog. Für den Fall der Fünfparameteranalyse wurden zunächst lymphozytäre Zellen im Punktwolkendiagramm Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht eingestellt. In einem weiteren Schritt wurden unter Verwendung eines Histogramms sämtliche Fluoreszenz 3 (Tricolour Red670)-negative Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im letzten Analyseschritt wurde dann in einem Punktwolkendiagramm die Markierung mit Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2 (der ausschließlich lymphozytären *und* Fluoreszenz 3 positiven) Zellen dargestellt. Bei Drei- und Vierparameteranalyse wurden 10.000 Ereignisse gemessen, bei Fünfparameteranalyse 20.000 Ereignisse.

2.6.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden meist mit einer Immunperoxidase-Technik durchgeführt (Vectastain, Vector, Burlingham, CA, USA oder Universelles Peroxidasenachweissystem, Coulter-Immunotech). Dazu wurden 5 µM dicke Gefrierschnitte luftgetrocknet, unspezifische Antikörperbindungsstellen mit einer Proteinlösung blockiert und mit dem Primärantikörper für ca. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte erfolgte die Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte mit Streptavidin-konjugiertem Peroxidase Reagens für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, nach erneutem Waschen für 10 – 40 Minuten Substrat zugegeben (Diaminobenzidin = DAB oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol = AEC) und anschließend eingedeckt.

2.7 Psoriasis-Induktion in der Severe Combined Immunodeficiency (SCID) Maus durch bakterielle Superantigene

2.7.1 Patienten und Patientenproben

Nach Information und schriftlicher Einwilligung wurden bei drei Patienten mit chronisch-stationärer Psoriasis bzw. bei drei gesunden Kontrollen Haut- und Blutproben entnommen. PBMC wurden aus heparinisiertem Vollblut wie oben beschrieben gewonnen. Vollhaut wurde nach örtlicher Betäubung von der Oberarminnenseite exzidiert, von subkutanem Fettgewebe präpariert und für bis zu 2h bis zur Transplantation in 4°C temperiertem PBS gelagert.

2.7.2 Verwendete Mäuse und interventionelles Vorgehen

2 – 3 Monate alte, weibliche, C.B17 severe combined immunodeficiency (SCID) Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Ulm pathogenfrei gehalten. Das operative Vorgehen ist von Boehncke et al. im Detail beschrieben (Boehncke et al., 1994). Mäuse wurden mittels einer intraperitonealen Injektion

bestehend aus einer Mischung von Midazolam und Fentanyl Dihydrogencitrat narkotisiert. Anschließend wurden auf den Rücken der Mäuse 8 – 10 mm Durchmesser große humane Vollhautstücke transplantiert. Die Transplantate wurden vor Ipsation durch Übernähen mit einer Tasche aus muriner Haut geschützt, in die eine sterile Fettgaze eingelegt wurde. Ca. 2 – 3 Wochen nach der Transplantation war die humane Vollhaut komplett angewachsen. Ab dem 28. Tag post transplantationem wurden intradermale Injektionen unter die Transplantate entsprechend der **Abb. 9** ausgeführt. Die Tiere wurden in jeweils drei Gruppen a 2 Mäuse eingeteilt, wovon einer Gruppe PBS, der zweiten das Superantigen exfoliatives Toxin (3 µg/Maus; Toxin Technology) und der dritten Gruppe exfoliatives Toxin subkutan sowie 2×10^6 PBMC intraperitoneal injiziert wurden. PBMC wurden dazu über 48h mit exfoliativem Toxin (100 ng/ml; Toxin Technology) in RPMI1640 in einer initialen Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml stimuliert. Drei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Transplantate mit einem Anteil der umgebenden murinen Haut entnommen. Die Haut wurde bei -80°C bis zur immunhistochemischen Bearbeitung gelagert.

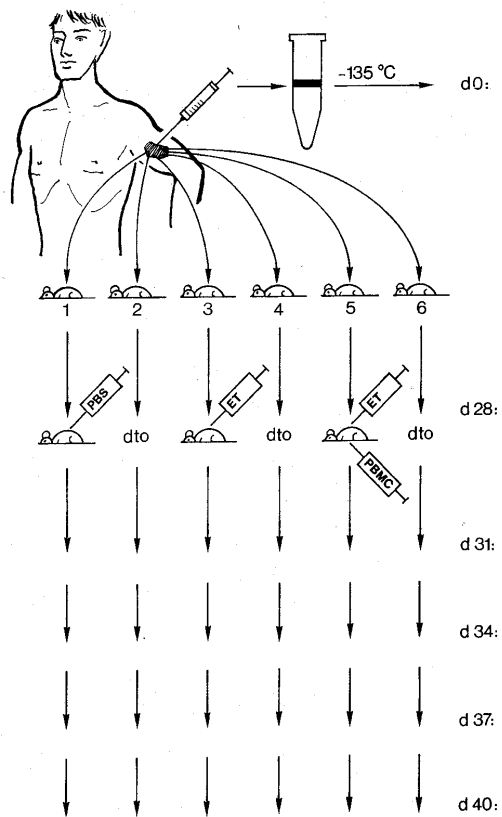


Abb. 9 Schema des experimentellen Designs

Aus: Boehncke et al., 1997.

2.8 Klinische Untersuchungen zum Schweregrad der atopischen Dermatitis unter dem Einfluß bakterieller Superantigene

2.8.1 Probanden und Probandenproben

65 Patienten mit mittelschwerer bis schwerer atopischer Dermatitis, 65 gesunde Kontrollen sowie 21 atopische Kontrollen wurden nach erfolgter Aufklärung und Einwilligung in die Studie aufgenommen. Das Vorliegen einer atopischen Dermatitis wurde entsprechend der Kriterien nach Hanifin und Rajka definiert (Hanifin und Rajka, 1980). Die Schwere der atopischen Dermatitis wurde mittels des SCORAD-Index festgelegt (Anonym, 1993). Atopische Kontrollpersonen gaben eine allergische Rhinokonjunktivitis oder allergisches Asthma in der Vorgeschichte an und wiesen ein erhöhtes Gesamt-IgE (> 140 kU/l) auf. Darüberhinaus konnten im RAST oder im Pricktest positive Reaktionen auf volatile Allergene nachgewiesen werden. Gesunde Kontrollen gaben keine atopischen Beschwerden in der Vorgeschichte an, hatten ein normales Gesamt-IgE und spezifische Sensibilisierungen gegen volatile Allergene konnten mit den o.g. Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Die drei untersuchten Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in Alter und Geschlecht. Invasive Untersuchungen (Blutentnahmen) erfolgten ausschließlich im Rahmen der erforderlichen klinischen Diagnostik.

2.8.2 Einschluß- und Ausschlußkriterien

Studieneinschlußkriterien beinhalteten: Einwilligung nach erfolgter Aufklärung, Verschlechterung einer vorbestehenden atopischen Dermatitis innerhalb der letzten vier Wochen vor Vorstellung mit einer mindestens 20%igen Zunahme der involvierten Körperoberfläche (bei Patienten mit atopischer Dermatitis), Alter > 17 Jahre.

Studienausschlußkriterien beinhalteten: Stabiler Erkrankungszustand, antibiotische oder systemische immunsuppressive Therapie innerhalb der letzten vier Wochen vor Vorstellung, Alter < 18 Jahre.

2.8.3 Isolation von *S. aureus* und Nachweis der von *S. aureus* produzierten Superantigene

Bei der Erstvorstellung der Probanden wurden von gesunder (Kontrollen) oder erkrankter Haut (Patienten) an den Ellenbeugen und der Nasen- und Rachenschleimhaut bakterielle Abstriche entnommen. Die Probenträger wurden auf nicht-selektive Blutagarplatten sowie auf Mannitolagarplatten mit 7,5% NaCl ausgestrichen. Kolonien von nicht-selektiven Agarplatten, die makroskopisch als *S. aureus*-Isolate definiert wurden, wurden mittels ihrer Agglutinationsfähigkeit im StaphSlide Kit (BioMerieux, Marcy l'etoile, Frankreich) weiter charakterisiert. Um die Produktion von Staphylokokken-Superantigenen nachzuweisen, wurden jeweils 5 Kolonien für 24h bei 37°C in einer sog. Hirn-Herz-Infusionslösung kultiviert. Überstände wurden unter Verwendung der Oxoid Toxin Detektions Kits TST-RPLA bzw. SET-RPLA (Unipath Limited, Hampshire, England) zur Detektion von TSST-1 bzw. von SEA – SED entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Sensitivität dieser Testmethode wird mit 0,5 ng/ml (SET-RPLA) bzw. mit 2 ng/ml (TST-RPLA) angegeben.

2.9 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten sind – soweit nicht anders erwähnt – als Mittelwert± Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte für parametrische, ungepaarte Werte unter Verwendung des Welch's t-Test mit Hilfe der BiAS 5.01 Software (H. Ackermann, Frankfurt). Falls zulässig wurden für parametrische, gepaarte Proben der Student's t-Test verwendet, beim Vergleich von mehr als 2 Parametern kam der Kruskal-Wallis Test oder ANOVA zur Anwendung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Bakterielle Superantigene spielen eine bedeutende Rolle bei der Induktion von T-Zell medierten Hautkrankheiten

3.1.1 Induktion einer psoriasiformen Dermatitis durch ein bakterielles Superantigen in einem SCID-hu xenogenen Transplantationsmodell

Die Psoriasis vulgaris, erstmals im Jahr 1803 von Robert Willian als Erkrankungsentität beschrieben, ist gekennzeichnet durch umschriebene, scharf begrenzte, erythematöse, silbrig-weiß schuppene Plaques, welche vornehmlich an den Streckseiten der Extremitäten lokalisiert sind. Histologisch ist diese Erkrankung durch eine epidermale Hyperproliferation, Akanthose und Papillomatose gekennzeichnet. In der Epidermis und insbesondere in der oberen Dermis findet sich ein dichtes lymphozytäres Infiltrat. Zahlreiche Faktoren sind an der komplexen Pathogenese der Psoriasis vulgaris beteiligt. So legen die epidermalen Veränderungen einen primären Defekt in der Regulation der Keratinozytenproliferation nahe. Andererseits wurde jedoch in den letzten 10 Jahren eine zentrale Bedeutung von T-Zellen für die Pathogenese der Psoriasis hervorgehoben. Dafür sprechen die Induktion einer Psoriasis bei einem Patienten sechs Monate nach Durchführung einer allogenen Knochenmarktransplantation von einem psoriatischen Zwillingsbruder (Gardembas-Pain et al., 1990) oder die erfolgreiche Therapie mit anti-CD4 Antikörpern (Prinz et al., 1991; Nicolas et al., 1991), einem DAB₃₈₉IL-2 Toxin (Gottlieb et al., 1995) oder der Blockade der T-Zellkostimulation durch ein CTLA4-Ig-Fusionsprotein (Abrams et al., 1999). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von T-Lymphozyten bei der Pathogenese der Psoriasis ist die Korrelation der Schwere der Erkrankung mit der Zahl der epidermalen CD8⁺ T-Zellen (Krueger et al., 1995). Die Bedeutung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen für den Verlauf der Psoriasis wird allerdings kontrovers diskutiert, da andere Arbeiten den Erkrankungsbeginn mit der Einwanderung von CD4⁺ und die Remission mit einer Zunahme von CD8⁺ T-Zellen in der Epidermis korrelieren konnten (Baker et al., 1984).

Um die Bedeutung der einzelnen Komponenten des Hautimmunsystems sowie einzelner exogener Faktoren bei der Induktion der Psoriasis näher zu untersuchen,

wurde ein xenogenes SCID-hu Transplantationsmodell entwickelt. In diesem Modell sollte die Bedeutung von T-Zellen sowie von bakteriellen Superantigenen bei der Induktion der Psoriasis analysiert werden. Der Begriff „Superantigene“ wurde für eine Gruppe von Substanzen geprägt, die große Anteile der T-Zell Rezeptor $V\beta+$ Zellen stimulieren können. Im Gegensatz zu konventionellen Peptid-Antigenen binden Superantigene nicht innerhalb der MHC-Bindungsgrube, sondern bewirken eine Art Brückenbildung zwischen MHC-Klasse II Molekül und TCR $V\beta$ Kette der T-Zelle (**Abb. 10**).

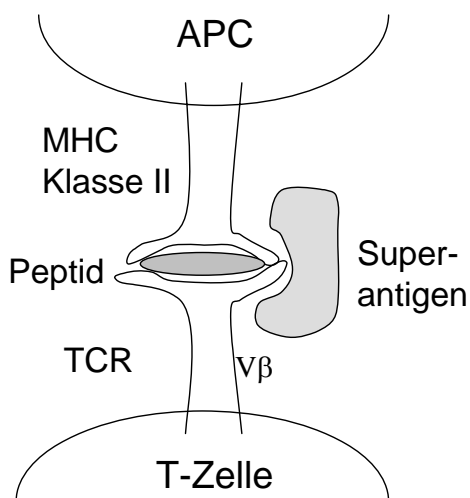


Abb. 10 Interaktion eines Superantigens im Vergleich zu einem Peptid-Antigen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen.

Nach: Boehncke und Zollner, 1999.

Die Bindung von Superantigenen an die $V\beta$ Kette des TCR ist verantwortlich für die Aktivierung eines großen Anteils der T-Zellen, da die Frequenz einzelner $V\beta$ -Ketten bis zu 10% des gesamten T-Zell Repertoires beträgt (z.B. TCR $V\beta 2$) und darüber hinaus einzelne Superantigene an verschiedene TCR $V\beta$ Ketten binden können (**Tab. 4**). Dermatologisch relevante Superantigene werden insbesondere von Staphylokokken und Streptokokken produziert. Diese Keime finden sich in großer Zahl auf der Haut sowie z.T. auf der Schleimhaut von Patienten mit Psoriasis vulgaris (Marples et al., 1973) oder atopischer Dermatitis (Leung et al., 1993a). Darüber hinaus produzieren Keime, die von der Haut isoliert wurden, bakterielle

Superantigene, was mit einer Veränderung des TCR V β Repertoires von T-Zellen der Haut korreliert werden konnte (Leung et al., 1993b; Lewis et al., 1993).

Tabelle 4: Superantigene und mit diesen interagierende V β -Segmente

Bakterium	Superantigen	Interagierendes V β -Segment
Staphylokokken	SEA	1.1, 5.3, 6.3, 6.4, 6.9, 7.3, 7.4, 9.1, 18
	SEB	3, 12, 14, 15, 17, 20
	SEC1	12
	SEC2	12, 13.2, 14, 15, 17, 20
	SEC3	5, 12, 13.2
	TSST-1	2
	ET*	2
Streptokokken	SPE-A	2, 12, 14, 15
	SPE-B	8
	SPE-C	1, 2, 5.1, 10
	pepM5	2, 4, 8

Nach: Boehncke und Zollner, 1999.

*Nach Fleischer und Bailey ist exfoliatives Toxin kein Superantigen und das von uns verwendete Produkt des Herstellers Toxin Technology mit einem anderen, nicht bekannten Superantigen verunreinigt (Fleischer und Bailey, 1992). In späteren Arbeiten wurde daher anstelle von ET TSST-1 verwendet, das ebenfalls TCR V β 2+ T-Zellen stimuliert.

Da bakterielle Superantigene (I) einen großen Anteil des T-Zell Repertoires aktivieren können, (II) bakterielle Infekte insbesondere der Psoriasis guttata vorausgehen und (III) T-Zellen eine zentrale Rolle für die Pathogenese der Psoriasis spielen, wollten wir in dem xenogenen SCID-hu Transplantationsmodell die Bedeutung bakterieller Superantigene bei der Induktion der Psoriasis überprüfen.

Der Phänotyp der Hauttransplantate wird durch das interventionelle Vorgehen nicht beeinflusst.

Dazu wurde – wie oben ausgeführt – nichtläsionale Haut von Psoriasispatienten bzw. Haut gesunder Kontrollen auf die SCID-Maus transplantiert. Ab dem 28.

postoperativen Tag wurde insgesamt viermal im Abstand von jeweils drei Tagen Kochsalz oder das Superantigen exfoliatives Toxin (ET) intradermal in das Transplantat gespritzt. Eine dritte Gruppe von Mäusen erhielt neben der intradermalen Injektion von ET zusätzlich intraperitoneale Injektionen von ET-stimulierten PBMC. Zunächst wurde der Einfluß von unspezifischen Irritationen durch repetitive Injektionen in das Transplantat untersucht. Diese Kontrolle ist insbesondere bei Untersuchungen zur Psoriasis vulgaris von besonderer Bedeutung, da die Induktion dieser Erkrankung durch einen sog. isomorphen Reizeffekt (Köbner Phänomen) bekannt ist (Melski et al., 1983). Dazu wurde PBS über einen Zeitraum von zwei Wochen intradermal in die Transplantate injiziert, um eine chronisch-mechanische Irritation zu imitieren. Danach wurden die Mäuse getötet und die Transplantate histologisch und immunhistochemisch untersucht. Sowohl die Haut von gesunden Kontrollen als auch die nichtläsionale Haut von Psoriasispatienten wurde durch diese Injektionen nicht beeinträchtigt (Boehncke et al., 1994; Nickoloff et al., 1995b). So zeigten sich bei beiden Gruppen keine nennenswerten Unterschiede in der Epidermisdicke oder dem Papillomatoseindex (**Abb. 11**). Immunhistochemisch exprimierten nur vereinzelt basale Keratinozyten das proliferationsassoziierte Antigen Ki67. Weiterhin zeigte sich keine ICAM-1 Expression in PBS-behandelten Transplantaten sowie ein nur sehr gering ausgeprägtes Infiltrat aus Neutrophilen und CD3+ Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Wiederholte intradermale Injektionen des bakteriellen Superantigens ET induzieren eine psoriasiforme Dermatitis.

Während die Injektion von PBS keine morphologischen Veränderungen der Transplantate bewirkte, induzierte die Injektion von ET in die nichtläsionale Psoriasishaut sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch einige klassische Zeichen der Psoriasis. So kam es zu einer ausgeprägten Akanthose mit einer Zunahme der Epidermisdicke um den Faktor 2 – 3 im Vergleich zu PBS-Behandlung. Diese ist auf eine Zunahme der Keratinozytenproliferation zurückzuführen, was durch eine verstärkte Expression von Ki67 nachweisbar ist. Weiterhin fand sich eine Verdoppelung des Papillomatoseindex sowie eine fokale ICAM-1 Neoexpression über der papillären Dermis (Daten nicht gezeigt; Boehncke et al., 1996 und 1997). Letzteres gilt als ein charakteristisches Zeichen von kutanen Entzündungen und ist besonders für die Psoriasis typisch (Uemura et al., 1993). Ähnlich der PBS-

Behandlung fanden sich auch nach ET-Injektion nur wenige T-Lymphozyten, jedoch zeigte sich ein deutliches Neutrophileninfiltrat. Somit kann man folgern, daß das Superantigen ET alleine bereits ausreichend ist, eine psoriasiforme Dermatitis in diesem Modell zu induzieren. Voraussetzung dafür ist allerdings ein bestimmtes, konditioniertes Mikromilieu bzw. bestimmte genetische Voraussetzungen, da bei gesunden Kontrollen ET keine derartigen Effekte zeigte. Somit ist die Berücksichtigung des genetischen Backgrounds bei Untersuchungen zum Einfluß von Superantigenen auf Immundermatosen von entscheidender Bedeutung (Jappe et al., 1998; Zollner und Kaufmann, 1999).

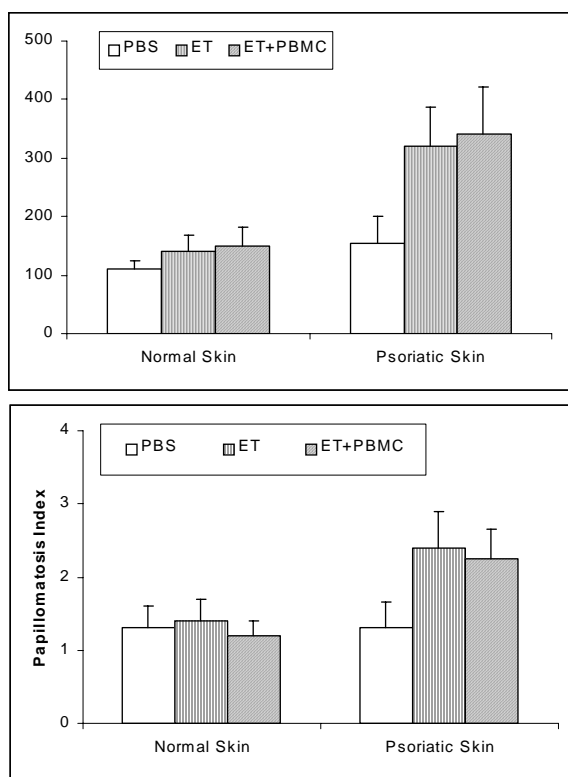


Abb. 11 Zunahme der epidermalen Dicke und des Papillomatoseindex der Transplantate von Psoriasispatienten nach Injektion von exfoliativem Toxin.

Exfoliatives Toxin (ET; 3µg/Maus) oder Kochsalz wurde intradermal in die auf die SCID-Maus transplantierte Haut von gesunden Kontrollen (schraffierte Balken) oder in die periläsionale Haut von Psoriasispatienten (schwarze Balken) wie in Material & Methoden beschrieben injiziert. Anschließend wurde die epidermale Dicke [µm] und der Papillomatose-Index bestimmt. Dargestellt ist der Median sowie die maximalen und minimalen Werte. Aus: *Boehncke et al., 1996.*

Die intraperitoneale Injektion von Superantigen-stimulierten PBMC verursacht ein CD3+, CLA+ Infiltrat in den Transplantaten von Psoriasispatienten.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß die intraperitoneale Injektion von T-Zellen in dem xenogenen SCID-hu Transplantationsmodell nicht zur Induktion einer Psoriasis führt (Boehncke et al., 1994). Aufgrund der oben geschilderten, zentralen Rolle von T-Zellen für die Psoriasis untersuchten wir den Effekt von Lymphozyten in diesem Psoriasisinduktionsmodell. PBMC, die von denselben Probanden bzw. Patienten wie die jeweiligen Transplantate entnommen wurden, wurden für 48h in vitro mit ET (100 ng/ml) stimuliert und anschließend intraperitoneal injiziert (2×10^6 Zellen/Maus). Transplantate von Mäusen, die sowohl ET als auch ET-stimulierte PBMC erhielten, unterschieden sich nicht wesentlich von denjenigen Transplantaten, die ausschließlich mit ET behandelt wurden. Dies bezog sich auf alle untersuchten makroskopischen sowie mikroskopischen Parameter mit einer Ausnahme: Während bei ausschließlich ET-behandelten Mäusen nur ein spärliches lymphozytäres Infiltrat anzutreffen war, kam es bei ET- und PBMC-behandelten Mäusen zu einer ausgeprägten T-Zell Infiltration der Haut, was durch Färbung mit zwei verschiedenen gegen humane T-Zellen gerichtete Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Die infiltrierenden T-Zellen exprimierten weiterhin das Haut-spezifische Adhäsionsmolekül CLA. Somit konnten wir folgern, daß in diesem experimentellen Modell die zusätzliche Verabreichung von Lymphozyten keinen funktionellen Einfluß auf die Ausprägung der Erkrankung hat. Eine fehlende Invasion der injizierten Zellen in das Transplantat als mögliche Ursache hierfür konnten wir ausschließen (Boehncke et al., 1996; Boehncke et al., 1997).

Das gemeinsame Auftreten von epidermaler Hyperproliferation und Entzündung ist ein charakteristisches Merkmal der Psoriasis. Histologisch finden sich Hyperparakeratose, Akanthose, Papillomatose sowie Kapillarerweiterungen und Lymphozyteninfiltration der oberen Dermis und Epidermis. Obwohl transgene Tiermodelle (Hammer et al., 1990; Wilson et al., 1990) und Mutationen bei Mäusen (Sundberg et al., 1994) beschrieben sind, deren Haut einige Merkmale der Psoriasis aufweisen, gab es zu der Zeit, als die hier geschilderten Experimente durchgeführt wurden, kein Tiermodell, in dem die Bedeutung einzelner Komponenten des

Immunsystems bzw. der Umwelt dissektiert werden konnten². Deswegen suchten wir nach einem Tiermodell, in dem eine T-Zell mediierte Dermatose durch proinflammatorische Stimuli getriggert werden konnte. Da es einige Hinweise dafür gab, daß es sich bei der Psoriasis um eine T-Zell-medierte Autoimmundermatose handeln könnte, die durch bakterielle Superantigene induziert wird (Valdimarsson et al., 1995), gingen wir der Frage nach, ob diese immunmodulatorischen Komponenten in dem etablierten xenogenen SCID-hu Transplantationsmodell von Bedeutung für die Psoriasis sein könnten.

Dabei konnte nachgewiesen werden, daß das bakterielle Superantigen ET eine psoriasiforme Entzündung verursacht. Die typischen Merkmale der Psoriasis waren makroskopisch, histologisch und immunhistochemisch nachweisbar. Insbesondere die fokale ICAM-1 Neoexpression über der papillären Dermis ist für diese Erkrankung typisch. Die Induktion einer psoriasiformen Dermatitis war spezifisch für Transplantate von nicht-läsionaler Psoriasis-Haut, da die Injektion von ET in Transplantate von gesunden Kontrollen keine derartigen Effekte zeigte. Hierfür könnten folgende Ursachen verantwortlich sein:

- In den Transplantaten befinden sich residuelle T-Zellen, wenn auch in geringer Zahl, die von Superantigenen aktiviert werden. Stimulation dieser Zellen durch Superantigene könnte ausreichend für die Induktion der Entzündungsreaktion sein. Wenige T-Zellen könnten darüber hinaus bereits maximale Entzündungsreaktionen hervorrufen, die durch die Injektion weiterer T-Zellen nicht mehr zu steigern ist. Hierfür spricht, daß bei der allergischen Kontaktdermatitis der Transfer von nur einer einzigen bzw. sehr weniger T-Zellen ausreichend ist, um bei einem nicht-sensibilisierten Organismus eine Entzündung zu induzieren (Marchal et al., 1982; Bianchi et al., 1981).
- Neben T-Zellen können auch andere Zellen des Hautimmunsystems von bakteriellen Superantigenen aktiviert werden. Hierzu zählen Antigen-präsentierende Zellen wie z.B. Zellen des dermalen Monozyten/Makrophagensystems (Weber-Matthiesen und Sterry, 1990).

² Seither sind neben unserem zwei weitere Tiermodelle beschrieben, in denen die Untersuchung von einzelnen Komponenten des Immunsystems möglich ist (Wrone-Smith und Nickoloff, 1996; Schön et al., 1997).

Diese können Superantigene an residente T-Zellen präsentieren und zu einer Expansion von insbesondere denjenigen T-Zellen führen, die ein T-Zell Rezeptor (TCR) V β Segment aufweisen, das mit dem jeweiligen Superantigen interagiert (s.o.; Nickoloff et al., 1993; Strange et al., 1994). Dies führt zu einer Verschiebung des TCR V β Repertoires, das bei akuten, nicht jedoch bei chronischen Läsionen nachweisbar ist (Leung et al., 1995b; Boehncke et al., 1995). Unter der Annahme einer potentiell autoaggressiven Subpopulation dieser expandierten T-Zellen erhalten diese in Anwesenheit der proinflammatorischen Stimuli ihr notwendiges zweites Signal, um die Immuntoleranz zu durchbrechen. Somit kann im weiteren Verlauf erklärt werden, wie es durch Stimulation mit einem putativen Autoantigen zu einem oligoklonalen T-Zell Infiltrat in der Psoriasis kommt (Chang et al., 1994; Menssen et al., 1995; Prinz et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen diese Daten eindrucksvoll, daß das Superantigen ET in der Lage ist, eine psoriasiforme Entzündung zu induzieren und erklären somit auf molekularer Ebene die klinische Beobachtung, daß der Induktion bzw. Exazerbation gehäuft bakterielle Infekte vorausgehen. Unabhängig von den pathogenetisch relevanten Mechanismen sind genetische Faktoren und damit das Mikromilieu der Haut entscheidend für die Etablierung dieser Entzündungsreaktion.

3.1.2 Die Besiedelung mit Superantigen-produzierenden *Staphylococcus aureus* ist mit der Schwere der atopischen Dermatitis assoziiert

Bei der atopischen Dermatitis werden neben genetischen Ursachen auch Umweltfaktoren bei der Manifestation dieser Erkrankung diskutiert. Bei den Umweltfaktoren spielen neben Allergenen bakterielle Infektionen bzw. eine massive bakterielle Besiedelung der Haut mit *Staphylococcus (S.) aureus* eine besondere Rolle. So ist die Haut von bis zu 90% aller Patienten mit *S. aureus* besiedelt (Leyden et al., 1974; Leung et al., 1993a). Eine Bedeutung von *S. aureus* bei der Pathogenese der atopischen Dermatitis wird vermutet, da eine antimikrobielle Therapie einen positiven Einfluß auf die Entzündungsreaktion der Haut ausübt (Hauser et al., 1985; Lever et al., 1988). Von der Haut isolierte *S. aureus* Isolate produzieren Superantigene, v.a. SEA, SEB und TSST-1 (Leung et al., 1993; McFadden et al., 1993). Da die epikutane Applikation von SEB auf die Haut von BALB/c Mäusen eine starke Entzündung hervorruft, die bei T-Zell defizienten SCID Mäusen unterbleibt, muß von einer zentralen Rolle von T-Zellen bei der Superantigen-medierten Entzündung ausgegangen werden (Saloga et al., 1996). Die Einwanderung von T-Zellen in die Haut wird durch Superantigene verstärkt (Herz et al., 1998; Strickland et al., 1999), was am wahrscheinlichsten durch eine Induktion des hautspezifischen T-Zell Rezirkulationsmoleküls CLA durch Superantigene verursacht wird (Leung et al., 1995a; Zollner et al., 1996; Zollner et al., 1997).

Die atopische Dermatitis ist bei ca. 80% aller Patienten mit einem erhöhten Gesamt-IgE assoziiert. Interessanter Weise fanden mehrere Gruppen auch eine Beeinflussung der IgE-Produktion durch bakterielle Superantigene (Hofer et al., 1995; Lester et al., 1995; Neuber et al., 1995; Herz et al., 1998). Trotz all dieser Evidenzen wurde die Bedeutung von bakteriellen Superantigenen für die Pathogenese der atopischen Dermatitis in Frage gestellt, da nur etwa 50% der *S. aureus* Isolate Superantigene produzieren und Superantigen-produzierende Isolate auch bei gesunden Kontrollen gefunden werden (Jappe et al., 1998). In diesen Untersuchungen sind allerdings genetische Faktoren nicht ausreichend berücksichtigt (Zollner und Kaufmann, 1999), da wir in den oben erwähnten Experimenten zeigen konnten, daß diese für die Superantigen-medierte Induktion

einer anderen T-Zell vermittelten Dermatose, der Psoriasis, von entscheidender Bedeutung sind (Boehncke et al., 1996; Boehncke et al., 1997).

Somit wollten wir die Prävalenz und Bedeutung von Superantigen-produzierenden *S. aureus* Isolaten bei Patienten mit atopischer Dermatitis untersuchen. Dazu korrelierten wir die Superantigen-Produktion mit der Gesamt-IgE Konzentration, der Anwesenheit von spezifischen anti-Superantigen IgE Antikörpern, den T-Zell Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen im peripheren Blut sowie der Schwere der atopischen Dermatitis, die mit dem SCORAD-Index gemessen wurde. Wir fanden eine Assoziation zwischen der Besiedelung der Haut oder Schleimhäute mit Superantigen-produzierenden *S. aureus* Isolaten und der Schwere der atopischen Dermatitis.

Superantigen-Sensibilisierung und Gesamt-IgE Konzentration

65 gesunde Kontrollen, 21 atopische Kontrollen und 65 Patienten mit atopischer Dermatitis wurden auf die Anwesenheit von Anti-Superantigen IgE Antikörper untersucht. Bei beiden Kontrollgruppen lag das SEA- bzw. SEB spezifische IgE unter 0,7 kU/l (Median SEA und SEB gesunde Kontrollen: je 0,2 kU/l; Median SEA und SEB atopische Kontrollen: je 0,2 kU/l). Im Gegensatz dazu waren 22/65 der Patienten mit atopischer Dermatitis (33,8%) gegen SEA und/oder SEB sensibilisiert (12/22 gegen SEA und SEB; 7/22 gegen SEB und 3/22 gegen SEA). Dabei betrug der Median von SEA-spezifischem IgE 1,9 kU/l und 1,6 kU/l von SEB-spezifischem IgE. Die IgE-Konzentration bei Superantigen-sensibilisierten Patienten war verglichen mit nicht-sensibilisierten Patienten signifikant höher (**Abb. 12**).

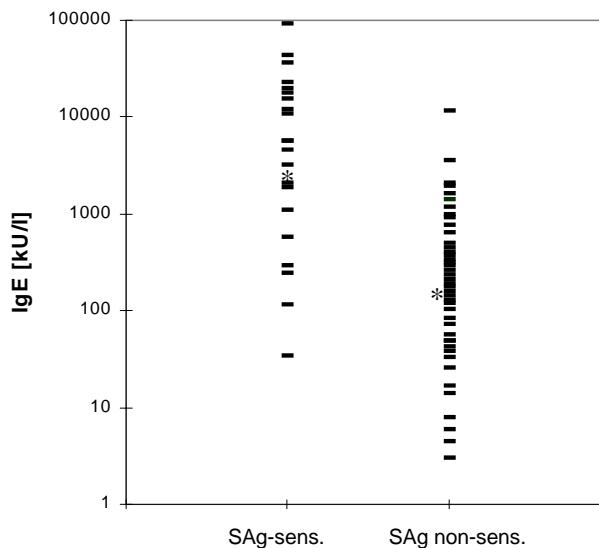


Abb. 12 Die Gesamt-IgE Konzentration von Superantigen-sensibilisierten Patienten ist signifikant höher als bei nicht-sensibilisierten Patienten.

* repräsentiert den Median der Gesamt-IgE Konzentration. SAg-sens., gegen Superantigene sensibilisierte Patienten (spezifisches IgE $\geq 0,7$ kU/l); SAg non-sens., nicht gegen Superantigene sensibilisierte Patienten (spezifisches IgE $< 0,7$ kU/l). Aus: Zollner et al., 2000.

Superantigen-Produktion und Gesamt-IgE Konzentration

Bei einer Untergruppe von 104 Personen (50 gesunde Kontrollen, 21 atopische Kontrollen, 33 Patienten mit atopischer Dermatitis) wurden jeweils drei bakterielle Abstriche entsprechend standardisierter Verfahren durchgeführt (Schmidt und Schmidt, 1996). Diese wurden von befallener (atopische Dermatitis) oder unbefallener Haut der Ellenbeugen (Kontrollen), der Nase und dem Rachen entnommen. Bei 15/50 Kontrollen wurde *S. aureus* nachgewiesen, davon produzierten 5/15 Isolate Superantigene (3x TSST-1, 1x SEB und 1x SEA und TSST-1). Bei 9/21 atopischen Kontrollen wurde *S. aureus* nachgewiesen, und auch hier produzierten 33% der Isolate Superantigene (1x SEA, 1x SEB, 1x SEA und TSST-1). Bei den Patienten mit atopischer Dermatitis war die Nachweisrate von *S. aureus* wie erwartet deutlich höher (23/33 Patienten). Bei 13/23 Isolaten (57%) gelang der Nachweis der Superantigen-Produktion (5x SEB, 3x TSST-1, 1x SEC, 1x SED, drei weitere Isolate produzierten mehr als ein Superantigen). Im Gegensatz zu einer Untersuchung bei Kindern mit Neurodermitis (Bunikowski et al., 1999) war bei Erwachsenen die Frequenz der Superantigen-produzierenden *S. aureus* Isolate bei

Superantigen-sensibilisierten Patienten im Vergleich zu nicht-sensibilisierten unverändert. Darüber hinaus waren v.a. Kinder mit mäßiger und schwerer atopischer Dermatitis gegen Superantigene sensibilisiert, wohingegen in unserer Untersuchung die Superantigen-Sensibilisierung erwachsener Patienten nicht mit der Höhe des SCORAD-Index assoziiert war (SCORAD-Index bei Superantigen-sensibilisierten Patienten 53 ± 18 vs. 48 ± 17 bei nicht-sensibilisierten).

Aufgrund des beschriebenen Einflusses von Superantigenen auf die Produktion von IgE in vitro untersuchten wir die Gesamt-IgE Konzentration bei Keimträgern, die mit Superantigen-produzierenden Isolaten besiedelt waren im Vergleich zu denjenigen, deren Isolate keine Superantigene produzierten. Bei beiden Kontrollgruppen war die Gesamt-IgE Konzentration tendentiell niedriger bei Personen, die mit Superantigen-produzierenden Keimen besiedelt waren (Gesunde Kontrollen: Median 81,5 kU/l bei Superantigen-produzierenden Isolaten im Vergleich zu 113,0 kU/l bei Superantigen-negativen Stämmen. Atopische Kontrollen: Median 412 kU/l bei Superantigen-produzierenden Isolaten im Vergleich zu 800,0 kU/l bei Superantigen-negativen). Auch bei Patienten mit atopischer Dermatitis war dieser Trend zu beobachten und war hier statistisch signifikant ($p < 0,05$). So betrug der Median bei Besiedelung mit Superantigen-produzierenden Stämmen lediglich 3.534 kU/l im Vergleich zu 11.176 kU/l (**Abb. 13**).

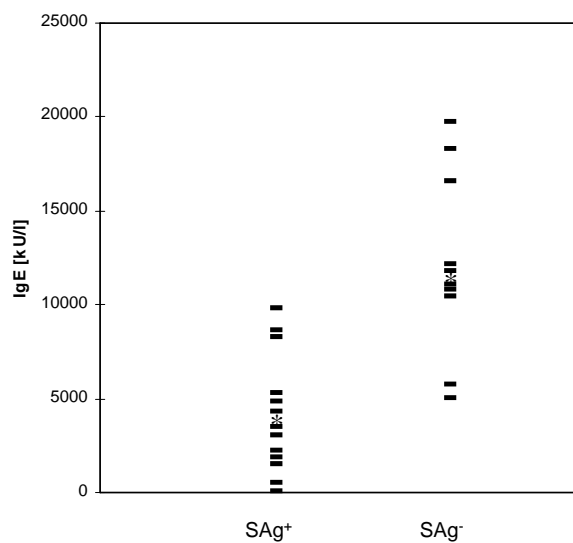


Abb. 13 Die Gesamt-IgE Konzentration korreliert invers mit der Besiedelung mit Superantigen-produzierenden *S. aureus* Isolaten.

* repräsentiert den Median der Gesamt-IgE Konzentration. SAg+, Patienten mit atopischer Dermatitis bei denen Superantigen-produzierende *S. aureus* Isolate nachweisbar waren. SAg-, Patienten, in denen keine Superantigen-Produktion der Isolate nachweisbar war. Aus: Zollner et al., 2000.

Superantigen-Produktion und SCORAD-Index

In einem SCID-Maus Modell konnte – ähnlich dem von uns publizierten Psoriasis-Modell – eine Verschlechterung einer allergischen Dermatitis in Anwesenheit eines Superantigens nachgewiesen werden (Herz et al., 1998). Wir untersuchten daher, inwiefern sich der Schweregrad der atopischen Dermatitis, gemessen mit dem SCORAD-Index, bei Patienten mit Superantigen-produzierenden Isolaten von denen ohne nachgewiesene Superantigen-Produktion unterscheidet. Bei der erstgenannten Gruppe betrug der SCORAD-Index 58 ± 19 Punkte, bei der letzteren 41 ± 7 ($p < 0,05$; **Abb. 14**).

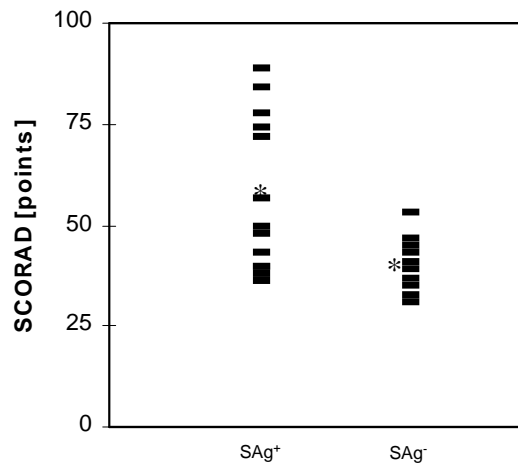


Abb. 14 Die Schwere der atopischen Dermatitis korreliert mit der Superantigen-Produktion von *S. aureus*.

* repräsentiert den Mittelwert der SCORAD-Indices. Aus: Zollner et al., 2000.

Superantigen-Produktion und T-Zell Phänotypisierung

Aufgrund der Effekte von Superantigenen auf die T-Zell Aktivierung und Adhäsionsmolekülexpression untersuchten wir diese ex vivo in den zwei Patientengruppen. Die absolute und relative Zahl von Lymphozytensubpopulationen (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16/CD56+) war in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden. Anders war dies allerdings bei Oberflächenproteinen, die bei einer T-Zell Aktivierung aufreguliert sind. So waren das frühe Aktivierungsmolekül CD69 und HLA-DR sowohl auf CD3+ und CD3+CD8+ in der Gruppe der Patienten signifikant aufreguliert, die mit Superantigen-produzierenden Stämmen besiedelt waren (**Abb. 15**; $p < 0,05$). Darüber hinaus war in dieser Gruppe die Expression von CLA sowie des nahe verwandten CD15s auf CD3+ und CD3+CD4+ signifikant aufreguliert (**Abb. 15**; $p < 0,05$). Die Expression eines Oberflächenantigens, das bei Darmmucosa-assoziierten Lymphozyten aufreguliert ist (BerACT-8), war bei beiden Gruppen gleich stark exprimiert (Daten nicht gezeigt).

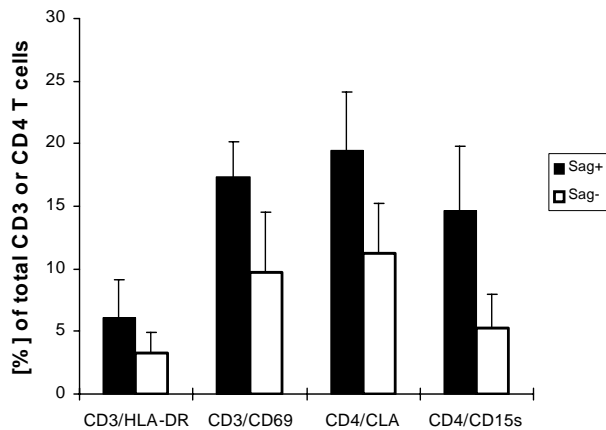


Abb. 15 HLA-DR, CD69, CLA und CD15s Expression auf T-Zellen korreliert mit dem Nachweis der Superantigen-Produktion von *S. aureus* Isolaten.

PBMC wurden von Patienten mit atopischer Dermatitis wie in Material und Methoden erwähnt isoliert. Schwarze Balken (SAg+) repräsentieren Patienten mit Superantigenproduzierenden Isolaten, offene Balken (SAg-) diejenigen, bei denen keine Superantigenproduktion detektierbar war. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. SAg+: n=13; SAg-: n=10; $p < 0,05$ für CD3/HLA-DR, CD3/CD69, CD4/CLA und CD4/CD15s Expression bei SAg+ vs. SAg-. Aus: Zollner et al., 2000.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß Neurodermitis-Patienten, deren Haut mit Superantigenproduzierenden Staphylokokken besiedelt sind, eine signifikant schwerere Erkrankung aufweisen im Vergleich zu Patienten, deren Haut mit Keimen besiedelt war, die keine Superantigene produzierten. Bereits in früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß *S. aureus* Isolate der Haut bzw. Schleimhaut in etwa 57 – 65% aller Patienten Superantigene produzieren (Leung et al., 1993a; McFadden et al., 1993; Akiyama et al., 1996). Die von uns gefundene Prävalenz von 54% lag somit im unteren Bereich dieser Ergebnisse. Direkte Evidenz für eine pathogenetische Bedeutung von Superantigenen für die atopische Dermatitis ergab sich aus Untersuchungen, bei denen diese auf nichterkrankte Haut bei Neurodermitis-Patienten appliziert wurde. Hierbei kam es zu einer Dermatitis mit Streureaktionen fernab des Auftragungsareals (Strange et al., 1996). Darüber hinaus wiesen überlebende von toxischem Schocksyndrom eine signifikant höhere Inzidenz von chronisch-rezidivierenden Dermatitis auf als Patienten mit septischem Schock ohne Superantigen-Beteiligung (Michie und Davis, 1996). Auch in Tiermodellen gibt

es deutliche Evidenzen dafür, daß Superantigene (allergische) Dermatitis negativ beeinflussen. Mit humaner Haut transplantierte SCID-Mäuse wurden mit PBMC von Der p sensibilisierten Patienten rekonstituiert und anschließend die transplantierte Haut mit Superantigenen behandelt. Dies führte zu einer ausgeprägten Akanthose, Parakeratose und Spongiose verbunden mit einem lymphozytärem Infiltrat. Die Dermatitis konnte durch simultane Exposition mit Superantigenen und Der p sogar noch verstärkt werden (Herz et al., 1998). Zusammenfassend läßt sich aus unserer und den zitierten Arbeiten schließen, daß *S. aureus* Superantigene Dermatitis in verschiedenen Tiermodellen sowie beim Menschen auslösen bzw. verstärken können.

Um die Mechanismen zu untersuchen, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, wurde in dieser Studie die Gesamt-IgE Konzentration bestimmt, da (1) IgE bei etwa 80% aller Neurodermitis-Patienten erhöht ist und mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Leung et al., 1998) und (2) die IgE-Konzentrationen durch Superantigene modifiziert werden. Falls bakterielle Superantigene die atopische Dermatitis verschlechtern, würde man eine Zunahme der IgE-Spiegel erwarten. Dies wurde bei in vitro Untersuchungen berichtet und trifft bei Stimulation mit niedrigen Superantigen-Konzentrationen (z.B. 0,01 pg/ml TSST-1) zu (Hofer et al., 1995; Lester et al., 1995; Neuber et al., 1995). Ursächlich für die Zunahme der IgE-Produktion ist die T-Zell abhängige B-Zell Aktivierung nach Bindung der Superantigene an die B-Zell MHC-Klasse II Moleküle sowie die T-Zell Rezeptor $V\beta$ Ketten der T-Zellen. In Abwesenheit von T-Zellen ist somit keine Veränderung der Superantigen-abhängigen IgE-Produktion zu beobachten (Hofer et al., 1995). Während niedrige Superantigen-Konzentration die IgE-Produktion stimulieren, haben hohe Superantigen-Konzentrationen (z.B. 1 pg/ml) einen gegenteiligen Effekt in vitro bei PBMC von Neurodermitis-Patienten und gesunden Kontrollen. Die Hemmung der IgE-Produktion ist wahrscheinlich auf $IFN\gamma$ und/oder $IFN\alpha$ zurückzuführen, welches in Anwesenheit von hohen, nicht jedoch bei niedrigen Superantigen-Konzentrationen in vitro freigesetzt wird (Hofer et al., 1995; Lester et al., 1995; Hofer et al., 1999). In unserer Studie machten wir die unerwartete Beobachtung, daß bei Patienten, deren Haut mit Superantigen-produzierenden Staphylokokken besiedelt war, die Gesamt-IgE Konzentration signifikant unter derjenigen von Patienten lag, deren Staphylokokken keine Superantigene produzierten. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in dem von Herz beschriebenen SCID-Maus Modell gemacht: So führte

die SEB-Behandlung der mit PBMC rekonstituierten SCID Mäuse zu einer Hemmung der allergen-spezifischen IgE-Produktion. Auch in diesem Modell wurde IFN γ als wesentliche Ursache für diesen Superantigen-medierten Effekt diskutiert (Herz et al., 1998). Eine negative Korrelation zwischen IFN γ -Spiegeln und Superantigen-mediierter IgE Produktion wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Hofer et al., 1999). Zusammenfassend deuten unsere Beobachtungen einer verminderten IgE-Konzentration bei Patienten, deren Haut mit Superantigen-produzierenden *S. aureus* Stämmen besiedelt ist, daraufhin, daß im Hautmilieu relativ hohe Superantigen-Konzentrationen wirksam sind, die zu einer nennenswerten IFN γ -Produktion führen. Eine erhöhte IFN γ -Produktion ist außerdem ein typisches molekulares Merkmal der atopischen Dermatitis (Grewe et al., 1995; Grewe et al., 1998) und die Superantigen-medierte verstärkte lokale IFN γ -Produktion durch Haut-infiltrierende CD4+ T-Zellen (Brown et al., 2000) ist wahrscheinlich für die Verschlechterung des Hautbefundes verantwortlich.

Andererseits ist zu diskutieren, inwiefern die Gruppe der Patienten, deren Haut mit Superantigen-produzierenden Stämmen besiedelt war, „weniger“ atopisch war als die Kontrollgruppe und dadurch die verminderte IgE-Konzentration bedingt ist. Falls dies zutreffen würde, unterstützt dieser Befund die Bedeutung von Superantigenen für die Verschlechterung der atopischen Dermatitis.

Da Superantigene zu den potentesten Aktivatoren von T-Zellen zählen (Marrack und Kappler, 1990), untersuchten wir den Einfluß von Superantigenen auf T-Zell Aktivierung und Adhäsionsmoleküle in vivo. T-Zell Aktivierungsmarker waren in der Gruppe von Patienten, deren Haut mit Superantigen-produzierenden *S. aureus* Stämmen besiedelt war, signifikant aufreguliert. Weiterhin war die Expression des Haut-Homing Moleküls CLA sowie des nahe verwandten CD15s auf T-Zellen signifikant überexprimiert. Diese Veränderung des Rezirkulationsverhaltens durch Superantigene kann zur vermehrten Invasion einer hoch aktivierten T-Zell Population führen. Diese sind in der Lage, in der Haut Zytokine freizusetzen und dadurch andere Zellpopulationen wie z.B. Keratinozyten zu aktivieren. Dadurch kann eine bestehende Dermatitis weiter verschlechtert werden.

Andererseits wurde *S. aureus* nicht von der Haut bzw. Schleimhaut aller Patienten isoliert. Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, daß ca. 60% aller Patienten nur vorübergehend mit *S. aureus* kolonisiert sind (Kluytmans J et al., 1997) und deswegen *S. aureus* zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht gefunden wurde.

Darüber hinaus produzierten nicht alle *S. aureus* Stämme Superantigene, sodaß andere Stoffwechselprodukte wie z.B. α - oder β -Toxine für die Verstärkung der Dermatitis ursächlich sein können. Schließlich sind selbstverständlich mikrobielle Faktoren nicht die einzigen Trigger für eine atopische Dermatitis. So konnte gerade bei einer Subgruppe von Patienten mit Lebensmittelallergien eine Verschlechterung der Neurodermitis durch diese Allergene nachgewiesen werden (Reekers et al., 1999) und dies könnte evt. die Patienten besonders betreffen, bei denen keine mikrobiellen Ursachen faßbar sind.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Untersuchung nachweisen, daß *S. aureus* Superantigene für eine Aggravierung einer atopischen Dermatitis, zumindest bei einer Subgruppe der Patienten, mit verantwortlich sind. Die T-Zell Aktivierung sowie Induktion von CLA scheinen hierfür von zentraler Bedeutung zu sein.

3.2 Molekulare Veränderungen des Hautimmunsystems durch Superantigene (I): T-Zell Rezeptor Repertoire

3.2.1 Präferentielle Verwendung von distinkten T-Zell Rezeptor V β Regionen epidermotroper T-Zellen in der Psoriasis

Die Psoriasis ist – wie die atopische Dermatitis - eine chronisch-rezidivierende Dermatose, von der ca. 2% der Bevölkerung betroffen sind. Wie oben bereits ausgeführt, spielen T-Zellen bei der Induktion der Psoriasis eine zentrale Rolle. Neben den oben bereits erwähnten indirekten Evidenzen konnte in den letzten Jahren deren unmittelbare Bedeutung bewiesen werden. So induzieren ex vivo-aktivierte, xenogene CD4+ Lymphozyten in einem xenogenen SCID-Maus Transplantationsmodell eine Psoriasis (Wrone-Smith und Nickoloff, 1996; Nickoloff und Wrone-Smith, 1999). Auch die Injektion von naiven, HLA-differenten T-Zellen in SCID-Mäuse löst in einem Tiermodell eine psoriasiforme Dermatitis aus (Schön et al., 1997), obwohl die Relevanz dieser Befunde für die Psoriasis in Anbetracht der HLA-Inkompatibilität kontrovers diskutiert wurde (Nickoloff und Wrone-Smith, 1997; Boehncke, 1997). Trotz der nachgewiesenen Bedeutung von T-Zellen bei der Pathogenese der Psoriasis sind die frühen molekularen Ereignisse, die zur Induktion dieser Erkrankung führen, noch weitgehend ungeklärt. In Anbetracht der Tatsache, daß insbesondere die Psoriasis guttata, jedoch auch Schübe einer chronisch-stationären Psoriasis, mit bakteriellen Infekten einhergehen (Norholm-Pedersen, 1952; Norrilind, 1955; Whyte und Baughman, 1964; Marples et al., 1973; Henderson und Hight, 1988), ergibt sich die Möglichkeit, bei dieser Erkrankung modellhaft nach frühen ätiologischen Faktoren zu suchen. So konnten wir oben bereits zeigen, daß in dem von uns etablierten SCID-Maus Modell das bakterielle Superantigen exfoliatives Toxin in der Lage war, eine psoriasiforme Dermatitis auszulösen.

Da Superantigene durch ihre Bindung an den variablen Anteil der β -Kette des T-Zell Rezeptors zu einer massiven Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in V β -abhängiger Weise führen, sollte sich - falls Superantigene in die Pathogenese der Psoriasis involviert sind – eine Expansion von Superantigen-assoziierten TCR V β + T-Zellen finden. In der Tat fanden Lewis und Mitarbeiter immunhistochemisch unter Verwendung von TCR V β -spezifischen Antikörpern eine Überrepräsentierung von V β 2+ T-Zellen bei der Psoriasis guttata (Lewis et al., 1993). Dies allein ist allerdings

kein Beweis für eine pathogenetische Bedeutung von Superantigenen, da auch Antigene eine Expansion von T-Zellen bewirken. Konventionelle Antigene führen zu einer klonalen Expansion, die mit Hilfe molekularbiologischer Techniken nachgewiesen werden kann. Hierzu zählt die Analyse des γ -Ketten Rearrangements, welche auch bei α/β + T-Zellen rearrangiert ist (Sterry und Staib, 1995), die Analyse des CDR3-Längenpolymorphismus (Manfras et al., 1997) oder die Klonierung und anschließende Sequenzierung der RT-PCR Amplifikationsprodukte (Chang et al., 1994; Menssen et al., 1995; Leung et al., 1995). Superantigene führen dagegen zu einer polyklonalen Expansion einzelner TCR $V\beta$ + T-Zellen, die mit einer der o.g. Methoden von der klonalen Expansion zu unterscheiden ist.

Wir untersuchten zunächst mit Hilfe einer großen Zahl von TCR $V\beta$ -spezifischen monoklonalen Antikörpern, inwiefern sich eine Veränderung des TCR $V\beta$ -Repertoires in der Haut im Vergleich zum peripheren Blut findet. Mit Hilfe der verwendeten Antikörper konnte knapp die Hälfte des TCR $V\beta$ -Repertoires dargestellt werden, gegen die andere Hälfte existierten zum damaligen Zeitpunkt keine Antikörper. Der Vorteil der Untersuchung mit immunhistochemischen Techniken liegt in der Möglichkeit, die exakte Lokalisation der T-Zellen (Epidermis oder Dermis) zuzuordnen. Die Nachteile dieser Methode bestehen darin, daß bei Nachweis einer Verschiebung des Repertoires zwischen Blut und Haut nicht festgestellt werden kann, ob es sich um ein klonales (d.h. Antigen-verursachtes) Geschehen oder um eine polyklonale (d.h. eher Superantigen-beeinflußte) Expansion handelt. Da jedoch bei fehlendem Nachweis einer Superantigen-typischen Repertoire Verschiebung ein Superantigen-Effekt unwahrscheinlich ist, wählten wir zunächst diesen Ansatz. Ein weiterer Nachteil bestand darin, daß nur die Hälfte des TCR $V\beta$ Repertoires untersucht werden konnte.

Nach Einwilligung wurden Biopsien von 9 Patienten mit chronisch-stationärer Psoriasis exzidiert und bis zur weiteren immunhistochemischen Untersuchung bei -80°C gelagert. Gleichzeitig wurde heparinisiertes Vollblut entnommen und daraus PBMC für die durchflußzytometrische Analyse des TCR $V\beta$ -Repertoires isoliert.

T-Zell Rezeptor V β Repertoire im peripheren Blut

Im peripheren Blut war keine nennenswerte Überexpression einzelner TCR V β + T-Zellen durchflußzytometrisch nachweisbar. Die interindividuellen Unterschiede waren relativ gering. Das Repertoire der Psoriatiker unterschied sich nicht wesentlich von demjenigen gesunder Kontrollpersonen oder Nickel-sensibilisierter Individuen (Daten nicht gezeigt). Zu den am häufigsten exprimierten TCR V β + T-Zellen zählten TCR V β 6+ und TCR V β 8+ T-Zellen. Keine TCR V β T-Zell Familie überstieg einen Anteil von 20% des gesamten α/β TCR Repertoires (**Abb. 16**).

T-Zell Rezeptor V β Repertoire der Haut

Haut-infiltrierende T-Zellen zeigten nur geringe Unterschiede in ihrem TCR V β Repertoire verglichen zu T-Zellen des peripheren Blutes. Bei 7/9 Patienten zeigte sich allerdings eine leichte Überrepräsentation von TCR V β 6+ T-Zellen, ähnliches war bei 6/9 Patienten bei TCR V β 8+ Zellen zu beobachten. Auch hier überstieg der Anteil einzelner T-Zell V β Familien nie 20% des gesamten α/β TCR Repertoires (**Abb. 16**).

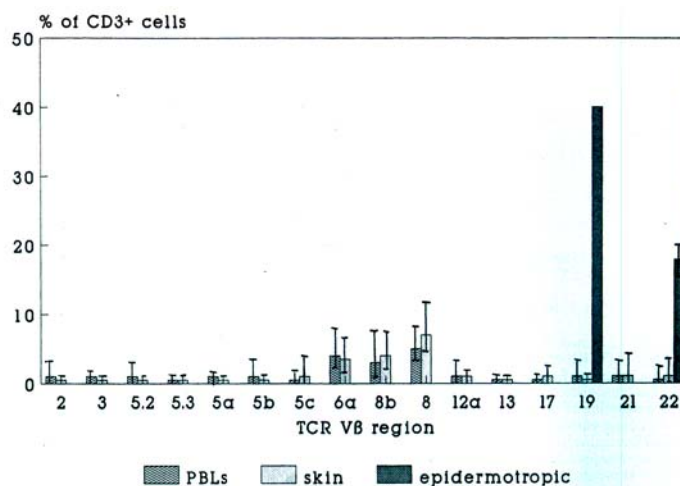


Abb. 16 Das T-Zell Rezeptor V β Repertoire peripherer Lymphozyten im Vergleich zur Haut bei chronisch-stationärer Psoriasis.

Die Ergebnisse zeigen den Median, minimale sowie maximale Werte bei 9 Patienten. Die Werte der epidermotropen T-Zellen bei TCR V β 19 und TCR V β 22 sind von einem bzw. von zwei Patienten dargestellt. Aus: *Boehncke et al., 1997*.

Präferentielle Expression von TCR V β 19 und TCR V β 22 bei 3/9 Patienten bei epidermotropen T-Zellen

Während sich im peripheren Blut und der Dermis keine wesentlichen Verschiebungen des TCR V β Repertoires nachweisen ließen, kam es in der Epidermis bei 3/9 untersuchten Patienten zu deutlichen Auffälligkeiten. So exprimierten ca. 40% aller epidermalen T-Zellen bei 1/9 Patienten die TCR V β 19 Kette, bei 2/9 Patienten exprimierten 20% aller epidermalen T-Zellen V β 22, welches im peripheren Blut und der Dermis kaum anzutreffen war (**Abb. 16**).

3.2.2 Das T-Zell Rezeptor Repertoire der Haut bei chronisch-stationärer Psoriasis ist restringiert, zeigt aber keine Häufung von Superantigen-assoziierten V β -Ketten

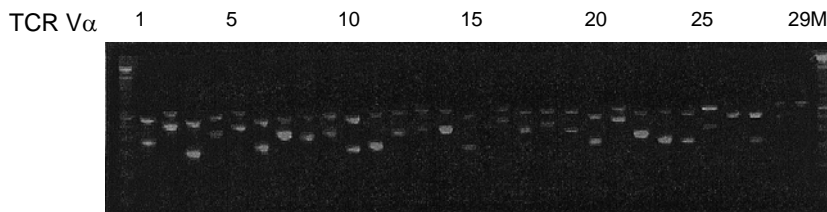
Nach Einwilligung wurde von Patienten mit chronisch-stationärer Psoriasis eine 4 mm Durchmesser große Hautprobe aus läsionler Haut am Ellenbogen sowie heparinisiertes Vollblut entnommen. Die Biopsien sowie die aus dem Vollblut isolierten PBMC wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -135°C gelagert. Anschließend wurde das TCR V α und V β Repertoire des peripheren Blutes und der Haut wie oben beschrieben analysiert und die Spezifität der Banden im Southern Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Das T-Zell Rezeptor Repertoire der psoriatischen Haut ist im Vergleich zum peripheren Blut restringiert

Die Amplifikation der Kontroll cDNA sowie der aus den Proben extrahierten und transkribierten DNA ergab distinkte Banden in der erwarteten Größe und den erwarteten Größenunterschieden zwischen Kontroll- und Proben-DNA (**Abb. 17**). Bei allen Patienten konnte die überwiegende Mehrheit der TCR V α und V β Ketten aus Proben des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von TCR V α 19, V α 29, V β 14 und V β 21 fanden sich in den untersuchten Proben zumindest bei einigen Patienten spezifische Amplifikationsprodukte. Beim Vergleich der TCR V α bzw. TCR V β Ketten, die mit der RT-PCR amplifiziert wurden, fanden sich in der Haut stets weniger Banden als im Blut. Im Durchschnitt waren in der Haut etwa vier V α bzw. V β Ketten weniger als im peripheren Blut nachweisbar. Es zeigte sich dabei jedoch kein

interindividuell reproduzierbares Muster abgesehen von einer Unterrepräsentation der TCR V α 8+ und TCR V β 23+ Zellen in der Haut.

Blut



Haut

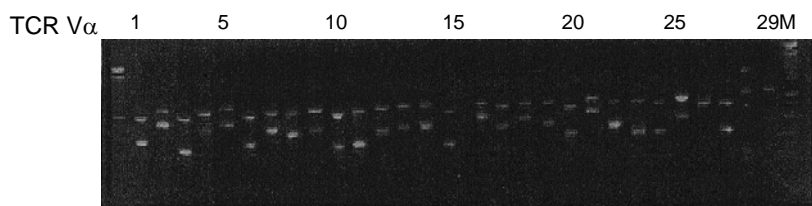


Abb. 17 Beispiel einer RT-PCR der TCR V α -Ketten aus dem Blut und der Haut.

Die totale RNA wurde von 0,5 g Biopsiematerial (Haut) bzw. von 2×10^6 PBMC (Blut) isoliert und in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde zusammen mit einer synthetischen Kontroll-DNA unter Verwendung von 29 spezifischen V α bzw. 25 V β Primern und eines spezifischen C Primers amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid markiert. Die oberen Banden repräsentieren die größeren synthetischen DNA-Amplifikate. Die Zahlen stehen für die jeweiligen TCR V α Familien. M: Längenstandard.

Das T-Zell Rezeptor Repertoire der psoriatischen Haut weist keine Anreicherung Superantigen-spezifischer V β -Ketten auf

Die Häufigkeit der einzelnen TCR V α oder V β Ketten im peripheren Blut der Patienten zeigten deutliche, interindividuelle Schwankungen. Mit Ausnahme von TCR V β 2 (Median: 10,2%) waren keine TCR V α oder V β Ketten zu mehr als 10% aller α/β + T-Zellen exprimiert (**Tabelle 5**). Ähnlich dem Repertoire im Blut wies auch das Repertoire der Haut nennenswerte, interindividuelle Unterschiede auf und außer den TCR V β 2+ (Median: 12,3%) T-Zellen war keine andere Familie zu über 10% in der Haut exprimiert.

Tabelle 5 Kein Nachweis einer Verschiebung des TCR V β Repertoires der Haut im Vergleich zum Blut bei chronisch-stationärer Psoriasis

	Blut ^a		Haut ^a	
Vα				
2	7,5	(6,7 – 8,7)	5,8	(4,8 – 7,7)
3	5,6	(4,7 – 6,6)	7,4	(6,5 – 8,9)
6	4,9	(4,0 – 5,6)	7,2	(4,8 – 9,4)
10	3,7	(3,0 – 5,0)	6,9	(4,7 – 9,3)
11	5,7	(5,0 – 6,2)	7,6	(6,7 – 9,5)
14	7,4	(5,1 – 9,4)	8,5	(6,4 – 9,8)
21	6,6	(4,6 – 7,7)	4,4	(3,3 – 6,3)
22	7,2	(5,3 – 9,6)	6,4	(5,7 – 7,4)
23	5,2	(4,0 – 6,2)	6,2	(4,4 – 7,2)
Vβ				
1	4,7	(2,2 – 6,7)	6,5	(4,2 – 14,6)
2	10,2	(8,7 – 12,7)	12,3	(10,9 – 13,5)
3	6,1	(1,6 – 10,3)	9,3	(1,5 – 15,4)
4	8,1	(6,2 – 10,1)	6,2	(1,1 – 8,7)
5	7,9	(6,5 – 9,9)	10,3	(7,8 – 12,6)
7	5,2	(2,6 – 9,6)	5,9	(1,4 – 8,5)
8	8,6	(5,6 – 13,4)	7,4	(4,9 – 9,6)
9	6,0	(3,8 – 7,6)	8,2	(6,4 – 9,2)
15	4,5	(2,6 – 6,2)	6,2	(3,1 – 7,9)
17	4,5	(2,4 – 7,1)	5,7	(2,4 – 6,9)
19	6,8	(1,2 – 11,8)	5,0	(0,0 – 11,7)
22	6,4	(4,4 – 10,6)	3,7	(0,0 – 7,6)

^aDie Zahlen geben die jeweiligen Prozentsätze aller α/β + T-Zellen an. Genannt ist der Median sowie minimaler und maximaler Wert (in Klammern) derjenigen TCR V α oder V β Familien, die mehr als 5% des gesamten Repertoires ausmachen. Aus: Boehncke et al., 1996.

Beim Vergleich des Repertoires der Haut und des Blutes fanden sich für die einzelnen TCR V α bzw. V β Familien sowohl verminderte als auch erhöhte Frequenzen. Kein genereller, interindividueller Trend war dabei nachweisbar. Insbesondere konnte die von anderen Autoren beschriebene Anreicherung von TCR V β 2, V β 5, V β 8 oder V β 12 nicht nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich gerade um diejenigen TCR V β Familien, die typischer Weise durch Staphylokokken- bzw. Streptokokken-Superantigene expandiert werden (**Abb. 18**).

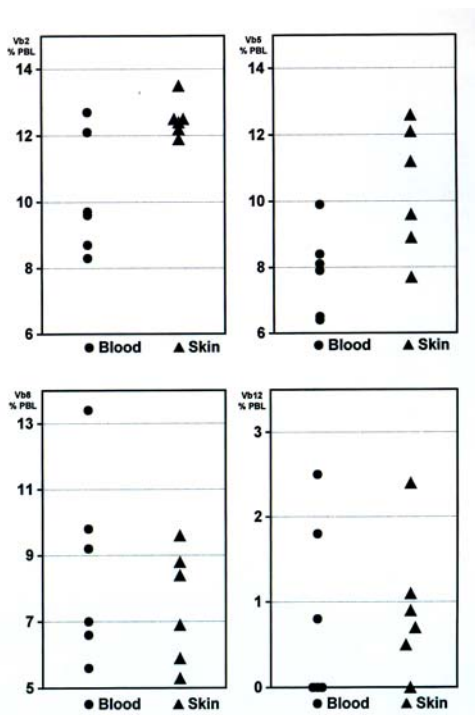


Abb. 18 Ähnliche Verteilung des TCR V β Repertoire des Blutes und der Haut ausgewählter TCR V β Familien.

RT-PCR Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2%ige Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurden die Banden gescannt und densitometrisch ausgewertet. Der Anteil der jeweiligen TCR V β Familien der Haut (Dreiecke) und des Blutes (Kreise) sind in Prozent aller TCR V β + Zellen dargestellt. Aus: Boehncke et al., 1996.

Ein zentrales histologisches Merkmal der Psoriasis ist die Infiltration mit aktivierten T-Helfer Zellen. Diese T-Zell Aktivierung kann Antigen- oder Superantigen-mediert sein. Da eine Assoziation zwischen der Induktion bzw. Exazerbation der Psoriasis und bakteriellen Infekten beschrieben ist (Norholm-Pedersen, 1952; Norrilind, 1955; Whyte und Baughman, 1964; Marples et al., 1973; Henderson und Highet, 1988) und wir darüber hinaus eine Induktion der Psoriasis durch Superantigene in einem xenogenen Tiermodell nachweisen konnten (s.o.), sind bakterielle Superantigene gute Kandidaten für die T-Zell Aktivierung bei der Psoriasis. Da die Superantigen-vermittelte T-Zell Aktivierung in TCR V β -spezifischer Weise erfolgt, ist damit eine Veränderung des TCR Repertoires verbunden. In der Tat wurde von zwei Gruppen mit unterschiedlicher Methodik (Immunhistologie und RT-PCR mit anschließender Sequenzierung der Amplifikate) eine Verschiebung des TCR V β Repertoires

beschrieben (Lewis et al., 1993; Leung et al., 1995). Dies wurde insbesondere bei Patienten mit Psoriasis guttata beobachtet. Bei der Sequenzierung der CDR3-Region fanden sich keine konservierten Motife, sondern eine große Vielfalt in der Länge und der Frequenz, was für einen Superantigen-medierten Effekt spricht (Leung et al., 1995).

Andererseits konnten wir in beiden oben ausgeführten Untersuchungen bei Patienten mit chronisch-stationärer Psoriasis keine Verschiebungen des TCR Repertoires finden. Methodische Gründe für diese Differenzen erscheinen unwahrscheinlich, da wir immunhistochemische und molekularbiologische Techniken einsetzten. Der fehlende Nachweis einer Verschiebung des TCR Repertoires schließt allerdings nicht grundsätzlich Superantigen-medierte Effekte aus, da bei der allergischen Kontaktdermatitis nachgewiesen werden konnte, daß für die Induktion einer Entzündungsreaktion sehr wenige, spezifische T-Zellen erforderlich sind (Bianchi et al., 1981; Marchal et al., 1982; Kalish und Johnson, 1990). Somit kann eine evt. bei einer Subpopulation vorhandene, Superantigen-medierte TCR-Repertoire Verschiebung durch die überwiegende Mehrheit der unspezifisch infiltrierenden T-Zellen verdeckt werden. Darüberhinaus führt eine T-Zell Aktivierung durch Superantigene zu einer initialen Verminderung und erst im weiteren Verlauf zu einer Zunahme der jeweiligen TCR $V\beta$ + T-Zellen (Wahl et al., 1993). Somit spielen zeitliche Faktoren bei der Detektion eines TCR Repertoire Shifts eine entscheidende Rolle und können ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse unserer im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen sein. Schließlich ist die Auswahl des untersuchten Patientengutes wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung. Während bei Leung et al. sowie bei Lewis et al. Patienten mit Psoriasis guttata untersucht wurden, untersuchten wir Patienten mit chronisch-stationärer Psoriasis. Auch bei einer anderen Arbeit zur chronisch-stationären Psoriasis wurde keine nennenswerte Verschiebung des TCR Repertoires nachgewiesen (Moss et al., 1997). Somit kann man spekulieren, daß bei der Induktion der Psoriasis bakterielle Superantigene von Bedeutung sind, nicht jedoch bei der Aufrechterhaltung des Erkrankungsprozesses.

Neben Hinweisen für eine Superantigen-medierte T-Zell Aktivierung gibt es auch Evidenzen für eine klonale, Antigen-induzierte T-Zell Aktivierung. So fanden Chang et al. bei CD8+ T-Zellen eine vermehrte Expression von TCR $V\beta$ 3+ und TCR $V\beta$ 13.1+, die sich bei wiederholten Biopsien zu späteren Zeitpunkten wiederholen

ließen (Chang et al., 1994). Auch in anderen Arbeiten ergaben sich bei der chronisch-stationären Psoriasis Evidenzen für einen Antigen-spezifischen Prozeß (Menssen et al., 1995; Vekony et al., 1997; Prinz et al., 1999). Zusammenfassend lassen sich diese Daten dahingehend interpretieren, daß abhängig von bestimmten genetischen Faktoren bakterielle Superantigene bei der Induktion der Psoriasis offensichtlich eine Rolle spielen. Wie im Folgenden noch ausgeführt wird, induzieren diese die Einwanderung von T-Zellen über eine Aufregulation des Haut-spezifischen Adhäsionsmoleküls CLA. Dadurch kommt es zu einer ausgeprägten T-Zell Infiltration der Haut mit hochaktivierten T-Zellen. Diese wiederum sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine freizusetzen, was u.a. zu einer Induktion von Klasse II Molekülen auf Keratinozyten und damit zu einer verbesserten (Super-) Antigenpräsentation führt. Unter den Haut-infiltrierenden T-Zellen befinden sich auch potentiell autoreaktive CD8+ T-Zellen, welche im Hautkompartiment ihr putatives Autoantigen finden und aufgrund der proinflammatorischen T-Zell und keratinozytären Stimuli ihre Immuntoleranz durchbrechen. Diese autoreaktiven T-Zellen proliferieren in situ in Anwesenheit ihres spezifischen Autoantigens und tragen so zur Aufrechterhaltung der Erkrankung bei (**Abb. 19**; Boehncke und Zollner, 1999).

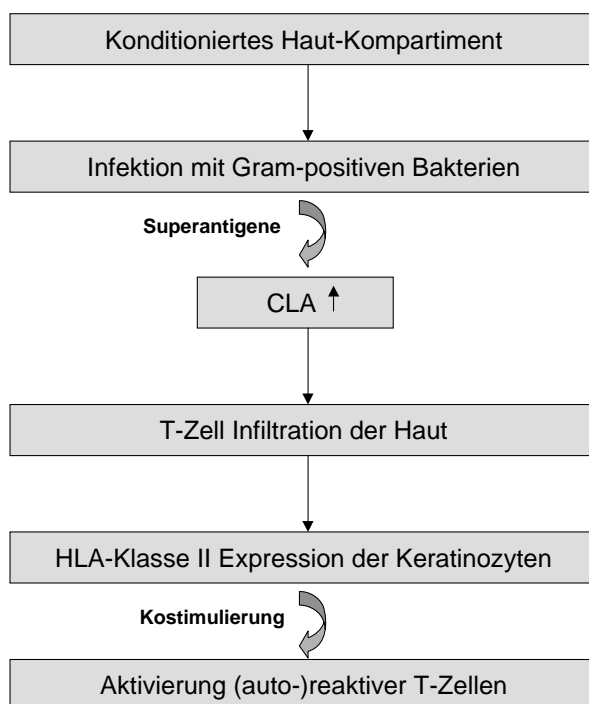


Abb. 19 Hypothese einer Superantigen-vermittelten Manifestation der Psoriasis als T-Zell vermittelte Autoimmunreaktion.

Aus: Boehncke und Zollner, 1999

3.3 Molekulare Veränderungen des Hautimmunsystems durch Superantigene (II): Expression des hautspezifischen Rezirkulationsmoleküls CLA

3.3.1 Das Superantigen Exfoliatives Toxin induziert die Expression des kutanen Lymphozyten-assoziierten Antigens auf peripheren humanen T-Zellen

Wie oben ausgeführt konnte gezeigt werden, daß bakterielle Infektionen T-Zell medierte Dermatosen wie die atopische Dermatitis oder die Psoriasis vulgaris verschlechtern können. Darüber hinaus lassen sich von Schleimhäuten oder der befallenen Haut der Patienten Keime isolieren, die bakterielle Superantigene produzieren. Schließlich ließ sich in mehreren Arbeiten eine Verschiebung des TCR Repertoires der Haut nachweisen, das mit einem Superantigen-medierten Prozeß vereinbar ist. Da Superantigene zu den stärksten Aktivatoren von T-Zellen zählen, wurde von zahlreichen Gruppen der Einfluß dieser bakteriellen Stoffwechselprodukte auf das Hautimmunsystem untersucht.

Neben der oben geschilderten Bedeutung von Superantigenen für die Induktion T-Zell mediierter Dermatosen in verschiedenen in vivo-Modellen sowie für das TCR Repertoire der Haut interessierte uns die Frage, inwiefern bakterielle Superantigene an einer Modulation der Rezirkulation von T-Zellen in die Haut beteiligt sind. Die rasche Einwanderung von T-Zellen in periphere Organe ist von zentraler Bedeutung für die Immunüberwachung des menschlichen Organismus. Sie dient der Erkennung und Zerstörung von potentiell gefährlichen Umweltstoffen. Andererseits gibt es zunehmend Hinweise dafür, daß exzessive Migrationsprozesse zu entzündlichen Veränderungen und bleibendem Gewebsschaden führen können (Albeda et al., 1994).

Da das initiale Tethering und Rolling von entscheidender Bedeutung für die anschließenden Prozesse der T-Zell Emigration aus dem Blut in periphere Organe wie die Haut ist, fragten wir uns, ob bakterielle Superantigene in diesen ersten und entscheidenden Prozeß eingreifen. Da CLA auf T-zellulärer Seite für diese initiale Interaktion mit dem Endothel von entscheidender Bedeutung ist, untersuchten wir die Regulation der T-Zell CLA Expression durch bakterielle Superantigene.

Dazu wurden nach Einwilligung sechs gesunden Individuen Blutproben entnommen und PBMC isoliert. Anschließend wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen ET (0 – 10 µg/ml), PHA (1 µg/ml), IL-2 (100 U/ml) oder Medium alleine für 4 Tage kultiviert und ihre Proliferationsrate bestimmt. Parallel dazu wurden PBMC für bis zu 10 Tage mit ET und den entsprechenden Kontrollen kultiviert und anschließend die Expression von CLA auf T-Zellen bzw. auf TCR Vβ2+ T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt.

Lymphozytenproliferation in Anwesenheit von Exfoliativem Toxin

Die Proliferationsrate von PBMC gesunder Individuen wurde in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von ET (100 pg/ml – 10 µg/ml) untersucht. Bereits bei 100 pg/ml zeigte sich im Vergleich zu unstimulierten PBMC eine Verdreifachung der Proliferationsrate. Diese erreichte bei einer Konzentration von 100 ng/ml ET ihr Maximum und fiel danach wieder ab (Daten nicht gezeigt). Wir verwendeten daher in den folgenden Untersuchungen eine Konzentration von 100 ng/ml ET.

Einfluß von Exfoliativem Toxin auf die T-Zell CLA-Expression

PBMC wurden mit ET über bis zu 10 Tage stimuliert und zu unterschiedlichen Zeiten die Zahl der TCR Vβ2+ Zellen gemessen. Dabei zeigte sich eine bis zu vierfache Zunahme der von ET stimulierten TCR Vβ2+ Zellen (**Abb. 20**). Stimulation mit dem Mitogen PHA veränderte die TCR Vβ2 Expression nicht.

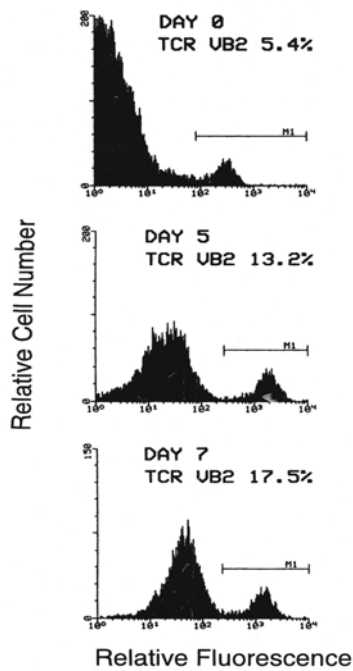


Abb. 20 Das Superantigen ET induziert eine Zunahme von TCR Vβ2+ Zellen

PBMC wurden über bis zu 10 Tage mit dem Superantigen ET (100 ng/ml) stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurde die Frequenz von TCR Vβ2+ Zellen, die durch ET selektiv stimuliert werden, mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives von drei Experimenten.

Das Superantigen ET induziert die Expression von CLA präferentiell auf TCR Vβ2+ im Vergleich zu TCR Vβ2- Zellen

Des weiteren induzierte ET die T-Zell Expression zeitabhängig sowohl auf TCR Vβ2+ und TCR Vβ2- Zellen. So fand sich bei 2/3 untersuchten Individuen die maximale CLA Expression am Tag 5, bei 1/3 am Tag 3 nach Beginn der ET-Stimulation. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten bis zu 69% aller CD3+ TCR Vβ2+ Zellen das HECA-452 Epitop (**Abb. 21**). Darüberhinaus kam es allerdings auch zu einer deutlichen, wenn auch geringeren Zunahme der CLA Expression auf TCR Vβ2- T-Zellen, die bei allen drei Individuen am Tag 5 ihr Maximum erreichte. Die CLA-Expression bei PHA-stimulierten Kulturen war sowohl auf TCR Vβ2+ und TCR Vβ2- Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nur leicht erhöht.

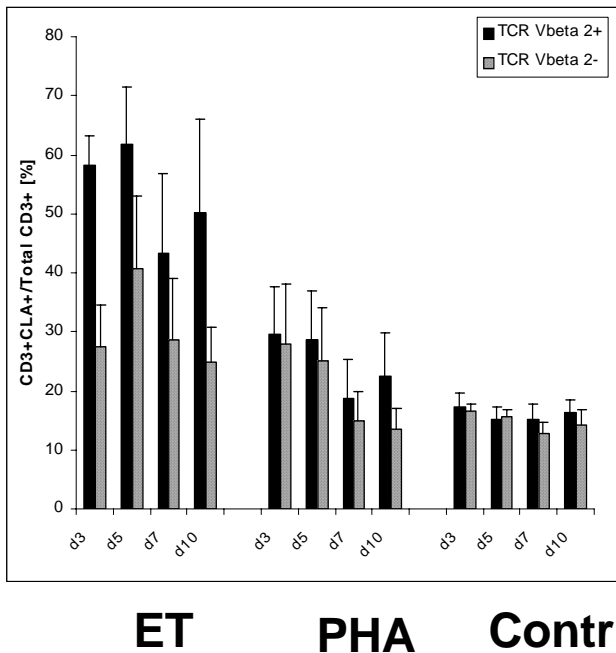


Abb. 21 Das Superantigen ET induziert die Expression von CLA präferentiell auf TCR V β 2+ im Vergleich zu TCR V β 2- T-Zellen.

PBMC wurden über bis zu 10 Tagen mit ET (100 ng/ml), PHA (1 μ g/ml) oder Medium stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CLA auf TCR V β 2+ im Vergleich zu TCR V β 2- Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Stimulation der T-Zelle über den TCR/CD3-Komplex induziert CLA-Expression.

Um zu untersuchen, ob auch andere Substanzen, die T-Zellen über den TCR oder den CD3-Komplex aktivieren, eine CLA Induktion bewirken, kultivierten wir PBMC mit dem OKT3 Antikörper (1 μ g/ml), der die T-Zelle über das CD3 Molekül stimuliert sowie mit Antigen-spezifischen Stimuli wie purified protein derivative (PPD; Statens Serum Institut, Copenhagen, Dänemark; 15 μ g/ml) bei BCG-immunisierten Probanden und mit hitzegetöteten Staphylokokken, die von Patienten-Isolaten hergestellt wurden (1×10^7 /ml). Dabei fanden wir die stärkste CLA-Induktion durch Stimulation mit dem OKT3-Antikörper, in geringerem Maße auch mit Antigen-spezifischer Induktion durch PPD und die hitzegetöteten *S. aureus* Isolate (Zollner et al., 1996; Daten nicht gezeigt).

Die Regulation der T-Zell Migration in die Haut ist derzeit kaum untersucht. Haut-infiltrierende T-Zellen exprimieren – im Gegensatz zu T-Zellen anderer peripherer

Organe – den E-Selektin Liganden CLA (Picker et al., 1990a). Die Interaktion von E-Selektin mit CLA ist von wesentlicher Bedeutung für das Tethering und Rolling von T-Zellen am Endothel. Fehlen diese Interaktionen mit dem Endothel, bleibt die Aktivierung der T-Zellen aus, die durch Chemokin – Chemokin-Rezeptor Interaktion reguliert wird. Da diese allerdings eine Voraussetzung für die weitere feste Adhäsion der T-Zellen am Endothel darstellt, ist die initiale E-Selektin – CLA Interaktion unabdingbar für die folgenden Prozesse der Interaktionskaskade (McEver et al., 1995).

Parallel zur Entwicklung von naiven zu Gedächtnis T-Zellen wird auch das HECA-452 Epitop auf T-Zellen exprimiert (Picker et al., 1993b). Die molekularen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind derzeit nicht vollständig untersucht. Es jedoch bekannt, daß in Anwesenheit von PHA einige Zytokine wie z.B. TGF β oder Zytokinkombinationen wie IL-2 + TGF β sowie IL-2 + IL-6, nicht jedoch PHA, IL-2 oder IL-6 alleine, zu einer Aufregulation der CLA-Expression führen (Picker et al., 1993b). Da insbesondere TGF β und IL-6 in großen Mengen bei entzündlichen Erkrankungen der Haut von Keratinozyten produziert werden, wird spekuliert, daß diese Zytokine über die Lymphgefäße zu den Lymphknoten drainiert werden, wo sie im Zusammenspiel mit stimulierenden Signalen der APC zu einer CLA-Induktion auf naiven T-Zellen führen können (Picker et al., 1993b).

Da wir und andere einen Zusammenhang zwischen der Induktion bzw. Schwere von T-Zell medierten Dermatosen und bakteriellen Superantigenen nachweisen konnten (Boehncke et al., 1996; Boehncke et al., 1997; Zollner et al., 1997a; Zollner et al., 2000) und die Infiltration von T-Zellen essentiell für diese Erkrankungen ist, fragten wir uns, inwiefern bakterielle Superantigene zu einer Veränderung der T-Zell CLA Expression und damit des Migrationsverhaltens der T-Zellen führen. Unsere Daten belegen, daß die CLA-Expression auf T-Zellen durch das Superantigen ET induziert wird, nicht jedoch durch das Mitogen PHA. Die Aufregulation betrifft nicht nur die TCR V β 2+ Population, die durch das Superantigen unmittelbar stimuliert wird, sondern auch – wenn auch in geringerem Umfang – die TCR V β 2- Population (Zollner et al., 1995; Zollner et al., 1996). Unklar bleiben die molekularen Mechanismen, die zu der beobachteten CLA-Induktion durch Superantigene führen. Bei einer ausschließlichen Induktion von CLA durch ET auf TCR V β 2+ Zellen spräche dieser Befund für eine Involvierung einer Signaltransduktionskaskade über die Aktivierung des TCR. In unseren Experimenten fanden wir allerdings eine CLA-

Induktion auch auf TCR V β 2- T-Zellen. Dies schließt somit aus, daß die T-Zell Aktivierung über den TCR Voraussetzung für eine CLA-Induktion ist. Zeitgleich zu den von uns durchgeführten Experimenten fanden auch andere Autoren eine Aufregulation von CLA durch die bakteriellen Superantigene SEB und TSST-1, nicht jedoch durch die Mitogene PHA und OKT3-Antikörper (Leung et al., 1995a). Die Autoren fanden darüber hinaus eine deutliche Stimulation der IL-12 Produktion durch Superantigene und neutralisierende Antikörper gegen IL-12 reduzierten die Superantigen-mediierte T-Zell CLA Induktion (Leung et al., 1995a). Da die Interaktion von CLA mit E-Selektin, das überwiegend auf chronisch entzündeten Endothelien der Haut exprimiert wird (Picker et al., 1991), von zentraler Bedeutung für die T-Zell Migration in die Haut ist (Butcher und Picker, 1996; Robert und Kupper, 1999), kann man aufgrund der o.g. Befunde annehmen, daß Superantigenstimulation zu einer verstärkten T-Zell Infiltration der Haut führt. Die Induktion der T-Zell Immigration in die Haut bei simultaner T-Zell Aktivierung erscheint wesentlich für die Auslösung von entzündlichen Dermatosen durch Superantigene.

3.3.2 Superantigen-, nicht jedoch Mitogen-Stimulation induziert selektiv die Expression von E-Selektin Liganden auf T-Zellen

Eine optimale Immunüberwachung erfordert eine möglichst rasche Einwanderung von Antigen-spezifischen Zellen in diejenigen Organe, die Kontakt mit potentiell gefährlichen Substanzen aus der Umwelt haben. Um dies zu gewährleisten, ist eine zielgerichtete, keine zufällige Einwanderung von Zellen in die jeweiligen Organe erforderlich (s.o.). Diese gezielte, wiederholte Einwanderung von immunkompetenten Zellen in die Organe, in denen ihre ursprüngliche Aktivierung (Priming) stattfand, wird Rezirkulation oder „Homing“ genannt. Das molekulare Korrelat dieses „Homing“ ist die Expression bestimmter Konstellationen von Adhäsionsmolekülen auf den immunkompetenten Zellen sowie den organspezifischen Endothelien, an die sie adhären. Das molekulare Korrelat von Haut-spezifischen T-Zellen ist die Oberflächenexpression von CLA, welches mit E-Selektin auf Endothelien interagiert. Wie oben beschrieben, ist CLA mit einem anderen Kohlenhydratepitop – dem CSLEX-1 Antigen (sLe^x/CD15s) – nahe verwandt. Dieses Epitop, das von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, ist ebenfalls für die Bindung an E-Selektin verantwortlich. CD15s wird jedoch nicht oder nur schwach auf ruhenden peripheren T-Zellen exprimiert, ist jedoch auf T-Zellen der Haut nachweisbar (Munro et al., 1992; Paavonen und Renkonen, 1992). Während CLA und CD15s für die initiale Interaktion mit E-Selektin und damit für das Rollen am Endothel verantwortlich sind, sind weitere Adhäsionsmoleküle für weitere Interaktionen mit dem Endothel verantwortlich, um schließlich die Extravasation zu gewährleisten. Zu diesen Molekülen zählen auf Seiten der T-Zellen u.a. die Integrine $\alpha 4/\beta 1$ (=VLA-4) sowie das $\alpha 1/\beta 2$ (=LFA-1; Butcher und Picker, 1996).

Um die Spezifität der Superantigen-mediierten CLA-Induktion zu überprüfen, untersuchten wir den Einfluß der Superantigene ET und TSST-1 im Vergleich zu dem Mitogen PHA auf die Expression einer großen Zahl von Adhäsions- bzw. kostimulatorischer Moleküle.

Die Stimulation mit dem Mitogen PHA induziert die Expression des „mucosal lymphocyte-associated antigen“ MLA

PBMC wurden mit den Superantigenen ET (100 ng/ml) bzw. TSST-1 (100 ng/ml), mit PHA (1 µg/ml) oder unstimuliert für bis zu 10 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Expression zahlreicher Adhäsions- und kostimulatorischer Moleküle durchflußzytometrisch bestimmt. Die Stimulation von PBMC mit PHA führte zu einer deutlichen Aufregulation der T-Zell MLA Expression. Diese war jedoch nicht spezifisch für MLA, da auch die Superantigene ET und TSST-1 zu einer MLA-Induktion ähnlichen Ausmaßes führte, die sich von der PHA-induzierten nicht signifikant unterschied (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Superantigen-stimulierten T-Zellen^a

Antikörper-reaktive T-Zellen/Gesamtzahl der T-Zellen [%]					
Mittelwert±Standardabweichung					
Antigen	Medium	PHA	ET	TSST-1	p^{b,c}
CD15s	7,9±3,8	12,8±4,8	30,1±5,6	31,9±4,2	p<0,05 (1, 2)
CLA	12,3±3,7	21,1±4,8	41,4±5,3	38,5±4,9	p<0,05 (1, 2)
MLA	4,7±2,3	20,0±4,3	18,9±3,2	16,9±4,1	n.s. (1, 2)

^aPBMC (3x10⁶/ml) wurden mit ET (100 ng/ml), TSST-1 (100 ng/ml), PHA (1 µg/ml) oder unstimuliert für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Expression der genannten Adhäsionsmoleküle durchflußzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse stellen die Zahl der Antikörper-reaktiven T-Zellen/Gesamtzahl der T-Zellen [%] dar. Dargestellt sind Mittelwerte±Standardabweichung von fünf unabhängigen Untersuchungen.

^b1: Wahrscheinlichkeit *p* für ET versus PHA.

^c2: Wahrscheinlichkeit *p* für TSST-1 versus PHA.

Aus: Zollner et., 1997.

Darüber hinaus fanden sich bei Antigenen, die bereits bei ruhenden T-Zellen stark exprimiert werden (CD2, CD11a, CD18, CD28, CD29, CD43, CD44, CD50, CD102), keine signifikanten Unterschiede nach Superantigen- im Vergleich zu Mitogen-Stimulation oder im Vergleich zu ruhenden T-Zellen. Bei den sog. „very late antigens“

(VLA) war bei CDw49c durch PHA und Superantigene eine etwa gleich stark ausgeprägte Induktion zu beobachten (Ruhende T-Zellen: $6,6 \pm 3,2\%$; PHA: $32,2 \pm 4,3\%$; ET: $35,1 \pm 4,6\%$; TSST-1: $35,1 \pm 6,8\%$; ET versus PHA und TSST-1 versus PHA jeweils n.s.). Andere Integrin α -Ketten wurden dagegen nur deutlich geringer induziert.

Die Superantigene ET und TSST-1 induzieren die E-Selektin Liganden CLA und CD15s

Weiterhin untersuchten wir die Expression der E-Selektin Liganden CD15s und CLA. CD15s war ab Tag 3 nach Beginn der Superantigen-Stimulation im Vergleich zu PHA-Stimulation signifikant aufreguliert ($p < 0,05$ für ET und TSST-1 versus PHA). Am Tag 5 nach Stimulation exprimierten $30,1 \pm 5,6$ der ET- bzw. $31,9 \pm 4,2\%$ der TSST-1 stimulierten T-Zellen das sialyl Lewis^x Antigen, wohingegen lediglich $7,9 \pm 3,8\%$ der ruhenden bzw. $12,8 \pm 4,8\%$ der PHA-stimulierten T-Zellen dieses Antigen exprimierten. Außer einer signifikanten Aufregulation von CD15s bei Superantigen-stimulierten T-Zellen im Vergleich zu Mitogen-stimulierten Kulturen wurde auch – wie bereits oben beschrieben – CLA durch beide Superantigene signifikant im Vergleich zu PHA aufreguliert (**Abb. 22, Tabelle 7**).

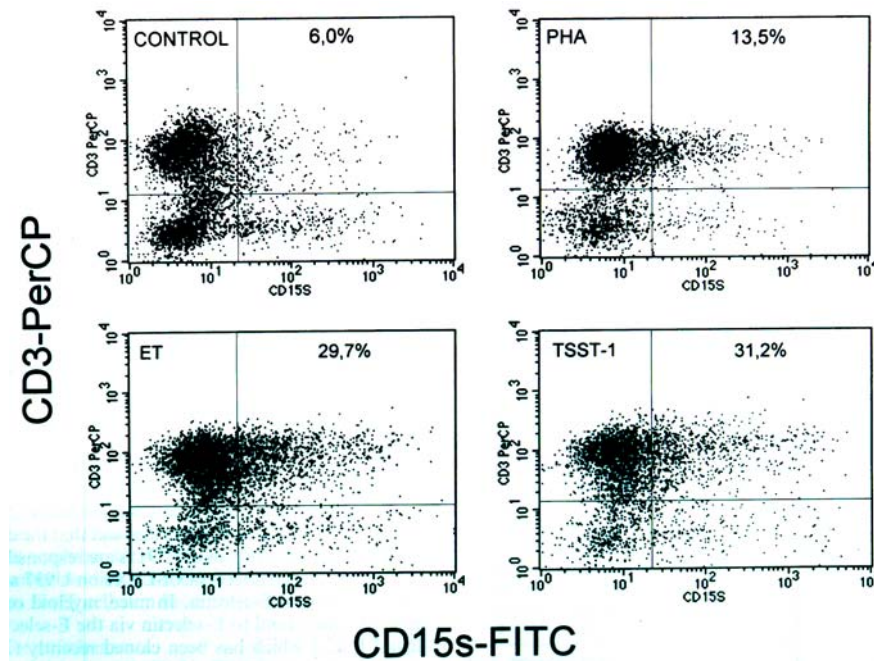


Abb. 22 Induktion der CD15s Expression auf T-Zellen durch die Superantigene TSST-1 und ET.

PBMC ($3 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit ET (100 ng/ml), TSST-1 (100 ng/ml), PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder unstimuliert für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurde ihre CD15s Expression unter Verwendung des CSLEX-1 Antikörpers durchflußzytometrisch gemessen. Die im oberen rechten Quadranten genannten Werte stellen die Zahl der Antikörper-reaktiven T-Zellen/Gesamtzahl der T-Zellen [%] dar. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten. Aus: Zollner et al., 1997.

Die Superantigen-medierte CLA und CD15s Expression persistiert über mindestens 10 Tage

Um die Kinetik und Dauer der CD15s Expression zu untersuchen, wurden PBMC für bis zu 10 Tage mit Superantigen oder PHA stimuliert. Bereits am 3. Tag zeigte sich bei Superantigen-stimulierten Kulturen ein Anstieg der CD15s Expression, der bei 5 Tagen ein Maximum erreichte und bis zum Tag 10 konstant blieb (**Tab. 7**). Die Kinetik der CD15s Expression ähnelt somit derjenigen von CLA (s.o).

Tabelle 7: CD15s Expression auf CD3+ T-Zellen nach Superantigen- oder Mitogen-Stimulation^a

Stimulus	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 10
Medium	6,8±3,3	8,4±3,5	7,9±3,8	6,1±5,0
PHA	6,5±2,9	8,1±3,1	12,8±4,8	10,3±5,1
ET	9,1±3,5	15,4±6,2	30,1±5,6	31,9±8,1
TSST-1	10,4±3,2	18,7±5,1	31,9±4,2	31,0±5,3

^aPBMC (3×10^6 /ml) wurden mit ET (100 ng/ml), TSST-1 (100 ng/ml), PHA (1 µg/ml) oder unstimuliert für bis zu 10 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD15s durchflußzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse stellen die Zahl der Antikörper-reaktiven T-Zellen/Gesamtzahl der T-Zellen [%] dar. Dargestellt sind Mittelwerte±Standardabweichung von fünf unabhängigen Untersuchungen. Aus: Zollner et al., 1997.

Unsere Daten zeigen, daß die bakteriellen Superantigene ET und TSST-1 nicht nur CLA, sondern auch das nahe verwandte Kohlenhydratepitop CD15s induzieren. (Gleichartige Ergebnisse konnten zwischenzeitlich auch für das neu beschriebene Streptokokken-Superantigen SMEZ nachgewiesen werden; Müller-Alouf et al., eingereicht). Die Aufregulation der beiden E-Selektin Liganden erfolgt spezifisch durch Superantigene, da das Mitogen PHA keine derartige Aufregulation bewirkt. Darüber hinaus konnten wir durch die Untersuchung einer breiten Palette an Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen nachweisen, daß Superantigene ausschließlich diese E-Selektin Liganden selektiv induzieren, wohingegen ein für den Magen-Darm-Trakt typisches Adhäsionsmolekül (MLA) von PHA und Superantigenen gleichermaßen lediglich gering induziert wird. Das von dem HML-1 Antikörper erkannte Integrin αE , das ebenfalls präferentiell von T-Zellen des Magen-Darm-Traktes exprimiert wird, wird dagegen ausschließlich durch PHA, nicht jedoch durch Superantigene induziert (Leung et al., 1995a). Andere T-zelluläre Antigene, die für die feste Adhäsion zwischen Endothel und T-Zellen verantwortlich sind, wurden durch Superantigene im Vergleich zu PHA nicht differentiell reguliert, sind allerdings z.T. bei ruhenden T-Zellen bereits stark exprimiert. Neben der Induktion der CLA sowie CD15s Expression wird auch deren in vitro Funktion verstärkt, wie wir durch Bindung an das rekombinante E-Selektin IgG Fusionsprotein nachweisen konnten

(Daten nicht gezeigt). Somit können wir aufgrund unser bisherigen in vitro Daten vermuten, daß Superantigene den ersten Schritt der T-Zell/Endothelzell Interaktion beeinflussen, nämlich das Tethering und Rolling am Endothel.

E-Selektin wird in zahlreichen, entzündlichen Gefäßen exprimiert, insbesondere jedoch in chronisch-entzündeten Gefäßen der Haut (Picker et al., 1991a). CLA bindet an E-Selektin (Berg et al., 1991): So konnte gezeigt werden, daß mit HECA-452 Antikörper affinitätschromatographisch aufgereinigtes Antigen an E-Selektin transfizierte Zellen bindet und daß der HECA-452 Antikörper die Bindung von T-Zellen an E-Selektin blockiert (Berg et al., 1991). Darüber hinaus banden CLA-exprimierende T-Zell Klone der Haut, nicht jedoch CLA-negative Klone aus dem Blut, an rekombinantes E-Selektin (Rossiter et al., 1994). E-Selektin bindet jedoch auch ein anderes, dem CLA nahe verwandtes Kohlenhydrat, nämlich sLe^x/CD15s (Philipps et al., 1990). Dieses Antigen wird insbesondere von Granulozyten und manchen Tumorzellen exprimiert (Philipps et al., 1990; Walz et al., 1990), jedoch nur gering von ruhenden T-Zellen (Berg et al., 1991a; Munro et al., 1992). Auf T-Zellen der Haut ist es im Gegensatz zu T-Zellen anderer Gewebe deutlich aufreguliert (Munro et al., 1992; Paavonen und Renkonen, 1992). Die Bindung von sLe^x an E-Selektin wurde bei benignen Zellen zunächst für Neutrophile nachgewiesen (Phillips et al., 1990; Walz et al., 1990; Tiemeyer et al., 1991). Außerdem konnte auch bei nicht-myeloischen Zellen nachgewiesen werden, daß die Transfektion mit der humanen FucT cDNA mit der Expression von sLe^x und der Bindung an E-Selektin einhergeht (Lowe et al., 1990). Darüber hinaus binden Leukozyten von FucT-VII defizienten Mäusen weder an E- noch an P-Selektin (Maly et al., 1996). Trotz dieser Evidenzen, die für eine Beteiligung von sLe^x an der Bindung an E-Selektin von Lymphozyten sprechen, wurde die Beteiligung von sLe^x an der E-selektin Bindung von Lymphozyten in Frage gestellt. So konnte die Bindung von sLe^x exprimierenden Lymphozyten an E-Selektin transfizierte CHO-Zellen durch einen anti sLe^x-spezifischen Antikörper (CSLEX-1) nicht inhibiert werden, wohingegen die Bindung von schwächer sLe^x-exprimierenden U937 Zellen durch diesen Antikörper inhibierbar war (Rotteveel et al., 1995). Gerade bei dieser Studie bleibt jedoch unklar, inwiefern die unterschiedliche sLe^x Expression auf den unterschiedlichen Zellpopulationen für die differentiellen Effekte des CSLEX-1 Antikörpers verantwortlich sind. So ist es durchaus denkbar, daß die verwendete Menge des CSLEX-1 Antikörpers zwar

ausreichte, die Interaktion zwischen sLe^x und E-Selektin zu verhindern, jedoch unzureichend war für die stärker sLe^x exprimierende Lymphozytenpopulation.

Unsere Daten erlauben somit die Spekulation, daß Superantigene durch die Induktion zweier E-Selektin Liganden eine verstärkte T-Zell Infiltration in die Haut begünstigen. Ob dieses zusätzliche Ligandenpaar allerdings von physiologischer oder pathophysiologischer Bedeutung ist, bleibt derzeit unklar. Die nahe Verwandtschaft zwischen CLA und sLe^x (s.o.), die gemeinsame Induktion von CLA und sLe^x durch FucT-VII Transfektion (Wagers et al., 1997) sowie die fast ausschließlich nachzuweisende Koexpression der beiden Moleküle (Picker et al., 1993b) sprechen gegen die Möglichkeit, daß die Bindung von sLe^x und CLA an E-Selektin über unterschiedliche Mechanismen erfolgt.

Wir vermuten, daß die Induktion von T-Zell medierten Dermatosen durch Superantigene zumindest z.T. über die verstärkte Einwanderung von hochaktivierten T-Zellen in die Haut erfolgt. Somit ist es von zentralem, therapeutischem Interesse, die Regulation der Expression und Funktion besser zu verstehen, um diese fehlgeleitete T-Zell Invasion zu modulieren.

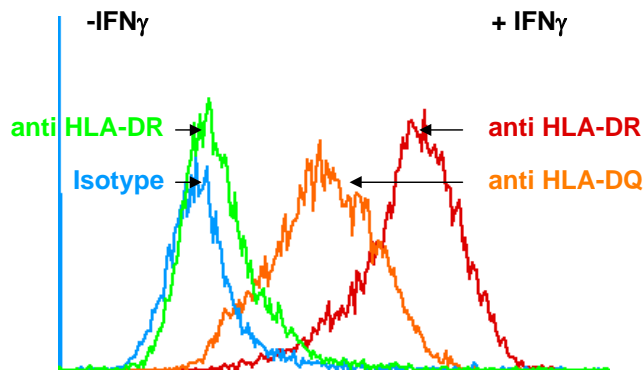
3.3.3 MHC Klasse II+ Keratinozyten präsentieren Superantigene an T-Zellen und induzieren die Aufregulation von CLA

Bakterielle Superantigene können nicht nur einen großen Anteil aller T-Zellen aktivieren, sie können darüber hinaus wie oben ausgeführt auch die Expression des Haut-spezifischen Adhäsionsmoleküls CLA aufregulieren. Bei diesen Versuchen wurden als Antigen-präsentierende Zellen Zellen des peripheren Blutes wie B-Zellen und Monozyten verwendet. Dieses Szenario ist somit insbesondere bei systemischen Infekten relevant, z.B. bei Tonsillitiden.

Da bei akuten Dermatitis eine Einwanderung auch von CLA-negativen T-Zellen in die Haut beschrieben ist (de Vries et al., 1997), fragten wir uns, ob Keratinozyten in der Lage sind, Superantigene an T-Zellen zu präsentieren und dadurch CLA zu induzieren.

IFN γ induziert die Expression von HLA-DR und HLA-DQ auf Keratinozyten

Um dieser Frage nachzugehen, entnahmen wir bei drei freiwilligen Probanden nach Einwilligung Hautproben von der Oberarminnenseite und kultivierten daraus Keratinozyten wie in Material und Methodik beschrieben. Nach einigen Passagen der Keratinozyten wurden diese für 48h mit IFN γ (1000 U/ml) stimuliert und die Expression der MHC Klasse II Moleküle durchflußzytometrisch gemessen. Wir fanden bei allen untersuchten Proben eine deutliche Aufregulation der HLA-DR und HLA-DQ Expression bei IFN γ -stimulierten Kulturen, die in Abwesenheit von IFN γ nahezu ausblieb (**Abb. 23**).



HLA Class II Expression

Abb. 23 Die Expression von HLA-DR und HLA-DQ auf Keratinozyten wird durch Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ induziert.

Frisch isolierte Keratinozyten wurden für 48h in Ab- oder Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ (1000 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Expression von HLA-DQ und HLA-DR mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

$\text{IFN}\gamma$ -stimulierte Keratinozyten präsentieren Superantigene an T-Lymphozyten und induzieren eine MHC Klasse II abhängige T-Zell Stimulation.

Weiterhin wurden von denselben Spendern T-Zellen aus peripherem Blut isoliert. Die Keratinozyten wurden über 48h in Ab- oder Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ (1000 U/ml) stimuliert und mit autologen T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TSST-1 (100 ng/ml) für 4 Tage kokultiviert, bevor die Kulturen für 18h mit ^3H -Thymidin versetzt wurden. Wir fanden eine niedrige basale Proliferation der Keratinozyten, die sich in Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ nicht signifikant änderte. Bei den Kokulturen aus Keratinozyten und T-Zellen war die Proliferationsrate höher als bei den Keratinozytenkulturen, was sich durch eine höhere Zellzahl in den Kulturen, die raschere Proliferation von T-Zellen im Vergleich zu Keratinozyten sowie durch Interaktionen zwischen den beiden Populationen erklären läßt.

Ein hochsignifikanter Unterschied in der Proliferationsrate zeigte sich ausschließlich bei Kokulturen, bei denen Keratinozyten zunächst mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und anschließend mit TSST-1 behandelt wurden im Vergleich zu Kokulturen, bei denen diese Vorstimulation der Keratinozyten mit $\text{IFN}\gamma$ ausblieb (**Abb. 24**). Somit liegt die Vermutung nahe, daß die Induktion der MHC Klasse II Moleküle eine wesentliche Voraussetzung für die Superantigen-Präsentation von Keratinozyten an T-Zellen ist,

ohne die es in Anwesenheit von TSST-1 zu keiner wesentlichen Zunahme der Proliferation kommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir dieselben Experimente in Anwesenheit von funktionsblockierenden anti MHC Klasse II Antikörpern durch. In der Tat kam es dabei zu einer kompletten Blockade der TSST-1 medierten Proliferation (**Abb. 24**).

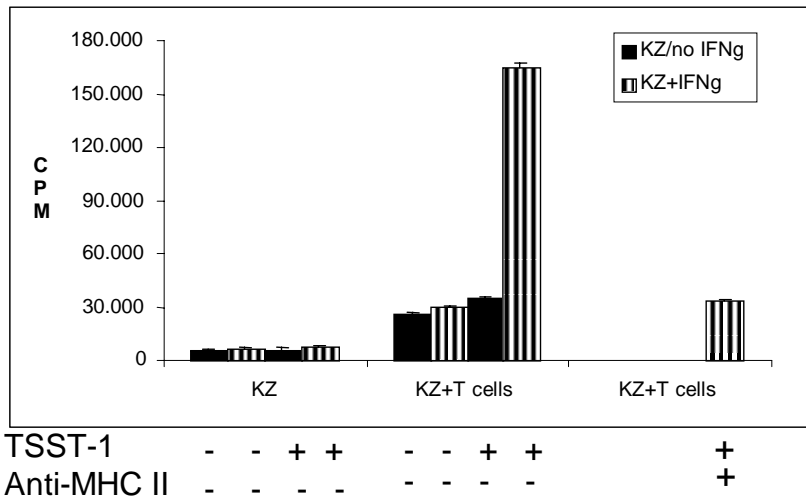


Abb. 24 **IFN γ -stimulierte Keratinozyten präsentieren Superantigene an T-Lymphozyten und induzieren eine MHC Klasse II abhängige T-Zell Stimulation.**

Frisch isolierte Keratinozyten wurden in Ab- oder Anwesenheit von IFN γ (1000 U/ml) für 48h kultiviert. Anschließend wurden sie mit autologen T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TSST-1 (100 ng/ml) für 4 Tage kokultiviert und für 18h mit 3 H-Thymidin versetzt. Danach wurde der Einbau von 3 H-Thymidin in die DNA mit Hilfe eines Betacounters gemessen. Außerdem wurden analoge Experimente in Anwesenheit eines funktionsblockierenden Antikörpers gegen MHC Klasse II Moleküle bzw. eines irrelevanten Kontrollantikörpers des gleichen Isotyps durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

IFN γ -stimulierte Keratinozyten induzieren in Anwesenheit von TSST-1 die Expression von CLA auf T-Zellen

Im weiteren untersuchten wir, ob die Präsentation von Superantigenen an T-Zellen durch IFN γ -stimulierte Keratinozyten zu einer Induktion der CLA-Expression auf T-Zellen führt. Dazu wurden Keratinozyten zunächst in Ab- oder Anwesenheit von IFN γ

(1000 U/ml) für 48h stimuliert, anschließend wurden die T-Zell/Keratinozyten-Kokulturen für 5 Tage in Ab- oder Anwesenheit von TSST-1 (100 ng/ml) kultiviert. Danach wurde die CLA-Expression auf T-Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Wir fanden ausschließlich bei IFN γ -stimulierten Keratinozyten, nicht jedoch bei Keratinozyten, die in Abwesenheit von IFN γ kultiviert wurden, eine Zunahme der CLA-Expression auf T-Zellen in Anwesenheit von TSST-1 (**Abb. 25**).

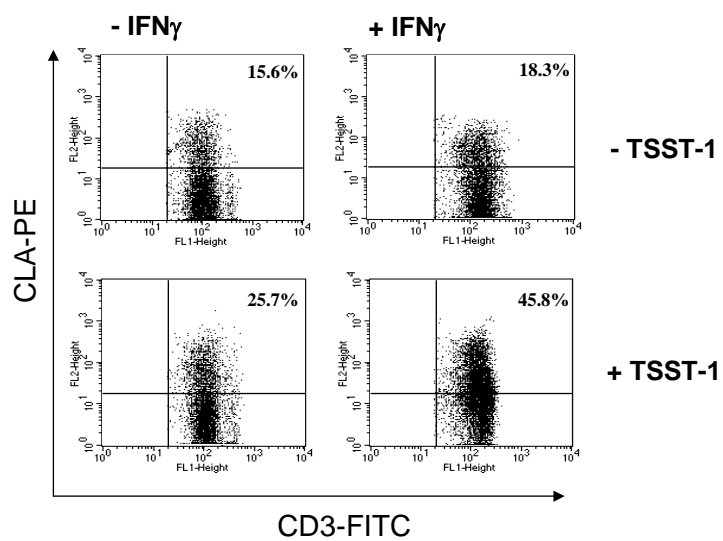


Abb. 25 IFN γ -stimulierte Keratinozyten induzieren in Anwesenheit von TSST-1 die Expression von CLA auf T-Zellen.

Frisch isolierte Keratinozyten wurden in Ab- oder Anwesenheit von IFN γ (1000 U/ml) für 48h kultiviert. Anschließend wurden sie mit autologen T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TSST-1 (100 ng/ml) für 5 Tage kokultiviert und die CLA-Expression auf T-Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Die Zahl der CLA+ T-Zellen in % aller T-Zellen ist jeweils im oberen äußeren Quadranten genannt. Die Ergebnisse zeigen ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

Die TSST-1 mediierte CLA Induktion unter Verwendung von Keratinozyten als Antigen-präsentierende Zellen ist MHC Klasse II und IL-6 abhängig

Somit erscheint auch hier die Induktion der MHC Klasse II Moleküle eine wesentliche Voraussetzung der für die CLA-Induktion in diesem Kokulturmodell. Da die CLA-Induktion nicht ausschließlich auf TCR V β 2+ Zellen beschränkt war, nahmen wir an, daß evt. lösliche Mediatoren in die CLA-Aufregulation involviert sind. Um diesen Fragen nachzugehen, führten wir analoge Versuche zu den oben geschilderten durch, wobei wir entweder die Antigen-Präsentation durch funktionsblockierende Antikörper oder die Funktion von Zytokinen durch neutralisierende Antikörper unterdrückten. Die Zugabe von anti MHC Klasse II Antikörpern blockierte annähernd komplett die CLA-Induktion durch das Superantigen, entsprechende Isotypkontrollantikörper zeigten keine derartigen Effekte (**Abb. 26** bzw. Daten nicht gezeigt). Desweiteren untersuchten wir die Wirkung von Antikörpern gegen TGF β , IL-6 und IL-12, da in früheren Publikationen eine Bedeutung dieser Zytokine für die Aufregulation von CLA gezeigt werden konnte (Picker et al., 1993b; Leung et al., 1995a). Dabei fanden wir lediglich bei Antikörpern gegen IL-6, nicht jedoch gegen TGF β oder IL-12 eine hemmende Wirkung auf die CLA-Expression (**Abb. 26**). Die CLA-Induktion konnte durch den verwendeten Antikörper allerdings nur partiell gehemmt werden, sodaß evt. weitere Zytokine an der Aufregulation von CLA in diesem Modell beteiligt sind. Zu niedrige Antikörperkonzentrationen hätten ebenfalls eine nur partielle Hemmung zur Folge. Dies halten wir jedoch in unseren Experimenten für unwahrscheinlich, da nach Herstellerangaben die verwendete Konzentration ausreichend ist, um 1000 U/ml IL-6 zu blockieren.

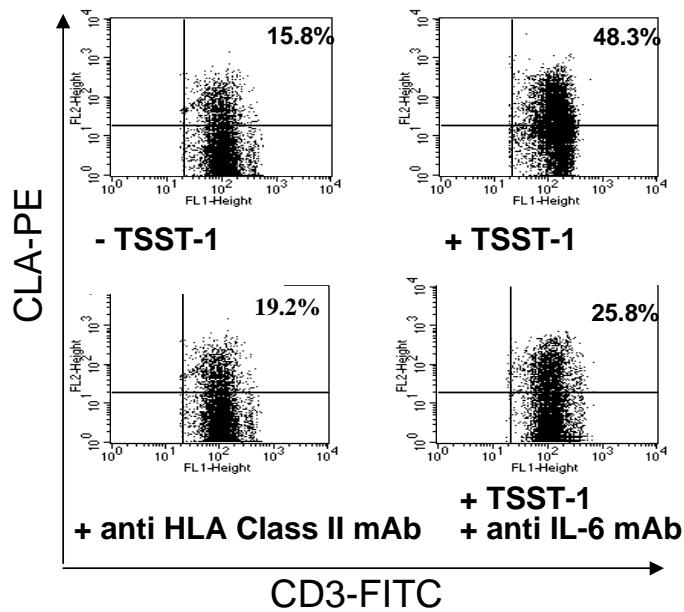


Abb. 26 Die TSST-1 medierte CLA Induktion unter Verwendung von Keratinozyten als Antigen-präsentierende Zellen ist MHC Klasse II und IL-6 abhängig.

Frisch isolierte Keratinozyten wurden mit $IFN\gamma$ (1000 U/ml) für 48h kultiviert. Anschließend wurden sie mit autologen T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TSST-1 (100 ng/ml) für 4 Tage kokultiviert und die CLA-Expression auf T-Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Außerdem wurden analoge Experimente in Anwesenheit eines funktionsblockierenden Antikörpers gegen MHC Klasse II Moleküle, gegen IL-6 bzw. von irrelevanten Kontrollantikörpern des gleichen Isotyps durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß nicht nur periphere Antigen-präsentierende Zellen Superantigene an T-Zellen präsentieren und die Expression von CLA induzieren, sondern daß dazu unter bestimmten Voraussetzungen auch Keratinozyten als Antigen-präsentierende Zellen geeignet sind. Als eine wesentliche Voraussetzung konnten wir hier die funktionelle Expression von MHC Klasse II Molekülen herausstellen. Diese werden *in vitro* unter dem Einfluß von $IFN\gamma$ rasch induziert. Ebenso können Keratinozyten auch *in vivo* MHC Klasse II Moleküle insbesondere bei T-Zell medierten Dermatosen exprimieren (Auböck et al., 1986). Keratinozyten sind dabei in der Lage, Prozessierungs-unabhängige Peptide zu präsentieren und eine T-Zell Proliferation zu induzieren, können Antigene allerdings nicht prozessieren (Gaspari und Katz, 1998).

Auch andere Autoren fanden, daß MHC Klasse II+ Keratinozyten neben Antigenen auch Superantigene an T-Zellen präsentieren können und diese dadurch aktivieren (Strange et al., 1994). Dabei scheint neben der Expression von MHC Klasse II Molekülen auf Keratinozyten die Bindung von ICAM-1 an den lymphozytären Liganden LFA-1 wesentlich für die Funktionalität dieser Interaktion zu sein (Nickoloff et al., 1993).

Da Superantigene unabhängig von der Art der Antigen-präsentierenden Zellen zu einer Induktion der CLA-Expression auf T-Zellen führen, halten wir folgendes Szenario für die Induktion der T-Zell Migration in die Haut für wahrscheinlich:

Im Falle der Besiedelung der Haut mit Superantigen-produzierenden Keimen, z.B. Staphylokokken, kommt es zunächst im Rahmen der immunologischen Auseinandersetzung mit diesem Keim zu einer entzündlichen Reaktion der Haut und einer Einwanderung von immunkompetenten Zellen, u.a. T-Lymphozyten. Diese sind zum überwiegenden Teil CLA+, können bei sehr akuten und stark entzündlichen Veränderungen jedoch auch CLA- sein (de Vries et al., 1996). Die Produktion von IFN γ durch infiltrierende T-Zellen induziert die Aufregulation von Klasse II Molekülen auf Keratinozyten. Dies ermöglicht, daß neben den professionellen nun auch nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie die Keratinozyten bakterielle Superantigene an T-Zellen präsentieren. Somit kann nun auch auf den CLA- T-Zellen, die die Haut im Rahmen der Entzündungsreaktion unspezifisch infiltriert haben, dieses Hautrezirkulationsmolekül aufreguliert werden. IL-6 ist dabei eines von mehreren involvierten Zytokinen. Neben der Induktion von CLA wird im Rahmen der entzündlichen Reaktion u.a. auch IL-1 und TNF- α produziert, was für eine Aufregulation des CLA-Liganden am Endothel, nämlich E-Selektin, verantwortlich ist. Im Falle einer systemischen Infektion, z.B. einer Tonsillitis, werden Superantigene v.a. von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen und Monozyten an T-Zellen präsentiert. Die Präsentation von Superantigenen an T-Zellen im Kontext von u.a. IL-12 führt dann zu einer Induktion des hautspezifischen Rezirkulationsmoleküls CLA, darüber hinaus bewirkt die Produktion von IL-1 und TNF- α im Rahmen des entzündlichen Prozesses die Aufregulation des CLA Liganden E-Selektin.

3.4 Modifikation der CLA-Expression auf transkriptioneller Ebene

3.4.1 Die Expression und Funktion des kutanen Lymphozyten-assoziierten Antigens CLA und $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII mRNA werden durch NF- κ B Inhibitoren supprimiert.

Die Migration von Lymphozyten in periphere Organe ist von zentraler Bedeutung für eine effiziente Immunüberwachung des Organismus. Um diese zu gewährleisten, infiltrieren naive T-Zellen die peripheren Lymphknoten. Dort ist eine optimale Antigenkonzentration aus den verschiedenen Organen im Kontext von Antigen-präsentierenden Zellen gegeben. Nach ihrer Aktivierung akquirieren sie – in Abhängigkeit vom Ort der ursprünglichen Antigenerkennung – ein neues Repertoire an Adhäsionsmolekülen, das dann die Extravasation in diejenigen Organe ermöglicht, in deren assoziierten lymphatischen Geweben diese T-Zellen aktiviert wurden. Obwohl die Leukozytenrezirkulation essentiell für die Immunüberwachung ist, kann eine unkontrollierte und verstärkte bzw. fehlgeleitete Rezirkulation von T-Zellen zu krankhaften Veränderungen führen (Johnson et al., 1993; Albelda et al., 1994; Granger und Kubes, 1994; Lowe und Ward, 1997). Auch bei entzündlichen Hautkrankheiten scheint dies der Fall zu sein. So gibt es bei der Psoriasis und der atopischen Dermatitis Hinweise dafür, daß eine Induktion von CLA bedeutsam für den Beginn bzw. die Chronifizierung der beiden Krankheiten sein könnte (Leung et al., 1995a; Abernathy-Carver et al., 1995; Boehncke et al., 1996; Zollner et al., 1996; Zollner et al., 1997; Robert und Kupper, 1999; Zollner et al., 2000). Aufgrund der Bedeutung von Selektin-Liganden bei der Initiierung des Kontaktes mit dem Endothel und der Überlegung, daß fehlgesteuerte Rezirkulationsprozesse von T-Zellen zu Gewebsschädigungen führen können, stellt die Hemmung der Selektin-Kohlenhydrat Interaktion eine vielversprechende Interventionsmöglichkeit bei entzündlichen Erkrankungen dar (Hynes and Wagner, 1996; Lowe und Ward, 1997).

Der E-Selektin Ligand CLA, der für die Einwanderung von T-Zellen in die Haut von entscheidender Bedeutung ist, entsteht durch posttranslationale Glykosylierung von PSGL-1 durch das Enzym $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII (FucT-VII; Borges et al., 1997; Fuhlbrigge et al., 1997). Die Transfektion von BJAB Zellen mit FucT-VII, nicht jedoch mit FucT-IV resultiert in der Neo-Expression von CLA und CD15s (Wagers et al., 1997).

Somit sind zwar der Proteinanteil von CLA bzw. CD15s sowie das in die Glykosilierung involvierte Enzym gut charakterisiert, die regulatorischen Prozesse der CLA-Expression auf molekularer Ebene allerdings weitgehend unbekannt. PHA/IL-2 oder anti CD3/anti CD28 Stimulation von T-Zellen in Anwesenheit von TGF β bzw. IL-12 oder Stimulation von T-Zellen mit Superantigenen in Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen führt zu einer Aufregulation der CLA-Expression (Picker et al., 1993b; Wagers et al., 1998; Leung et al., 1995; Zollner et al., 1995; Zollner et al., 1996). Auffallend ist, daß all diese Stimuli die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B gemeinsam haben (Baeuerle und Henkel, 1994; Hong et al., 1997). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung einer großen Anzahl proinflammatorischer Moleküle verantwortlich ist (Baeuerle und Henkel, 1994). Es ist ein heterodimeres Molekül, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, das in inaktiver Form im Zytoplasma an die inhibitorische Untereinheit I κ B gebunden ist. Durch die Aktivierung von NF- κ B wird I κ B durch I κ B Kinasen phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend durch Proteasomen degradiert (Regnier et al., 1997; Lin et al., 1998). Die aktiven Untereinheiten werden dann in den Zellkern transloziert, wo sie an spezifische DNA Sequenzen binden. Putative NF- κ B Bindungsstellen wurden auch im Promotor von FucT-VII nachgewiesen (Hiraiwa et al., 1997), aber der unmittelbare Nachweis für eine Bedeutung von NF- κ B für die FucT-VII Transkription oder CLA-Expression ist bisher noch nicht erbracht.

Wir untersuchten daher den Einfluß mehrerer Substanzen, von denen eine Hemmung der NF- κ B Aktivierung bekannt ist, auf die Expression und Funktion von CLA. Das immunmodulatorische Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein (NAC) interferiert mit dem frühesten Schritt der NF- κ B Aktivierung. Es hemmt diese durch die Suppression der I κ B Kinase Aktivität und verhindert dadurch die Phosphorylierung und anschließende Degradation von I κ B (Spiecker et al., 1998). Die Substanzen (E)3-[(4-Methylphenyl)Sulfonyl]-2-Propennitril (Bay11-7082) und (E)3-[(4-*t*-Butylphenyl)Sulfonyl]-2-Propennitril (Bay11-7085) inhibieren die aktivierungsinduzierte I κ B Phosphorylierung (Pierce et al., 1997). Proteasomeninhibitoren wie Lactacystin oder MG132 inhibieren die Proteasenaktivität selektiv im Proteasom und verhindern dadurch die Degradierung von I κ B und die nukleäre Translokation von NF- κ B (Lee und Goldberg, 1998; Karin und Delhase, 2000). Wir untersuchten daher den Einfluß der genannten NF- κ B

Inhibitoren auf die T-Zell CLA Expression und Funktion und fanden, daß sie diese wahrscheinlich über eine Hemmung der FucT-VII Transkription inhibieren.

PHA/IL-2/TGF β -Stimulation induziert die NF- κ B DNA-Bindung in humanen T-Zellen und diese wird durch NAC, Bay11-7082 und Lactacystin inhibiert.

Hochgereinigte T-Zellen wurden mit PHA (1 μ g/ml), IL-2 (100 U/ml) und TGF β (50 ng/ml) stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn (0 – 8 h) wie in Material und Methoden beschrieben isoliert und ihre NF- κ B Bindung unter Verwendung von 32 P-markierter Oligonukleotide untersucht. Dabei konnte 60 Minuten nach Stimulationsbeginn ein Protein-DNA Komplex nachgewiesen werden, wobei das Maximum dieses Komplexes nach etwa 4 – 5h auftrat (**Abb. 27**). Der PHA/IL-2/TGF β -induzierte Protein DNA Komplex wurde unter Zuhilfenahme von p50 und p65 spezifischer Antikörper weiter charakterisiert. Die p50 und p65 Untereinheiten bilden Heterodimere, die nach Stimulation mit verschiedensten Stimuli von fast allen Zellpopulationen gebildet werden. Annähernd der gesamte Protein DNA Komplex wurde in Anwesenheit von Antikörpern gegen die NF- κ B Untereinheiten p50 (Spur 12) und p65 (Spur 13) retardiert, wohingegen ein unspezifischer Kontrollantikörper keinen derartigen Effekt hatte (Spur 14). Somit induziert die Stimulation mit PHA/IL-2/TGF β v.a. die DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p65 (**Abb. 27**).

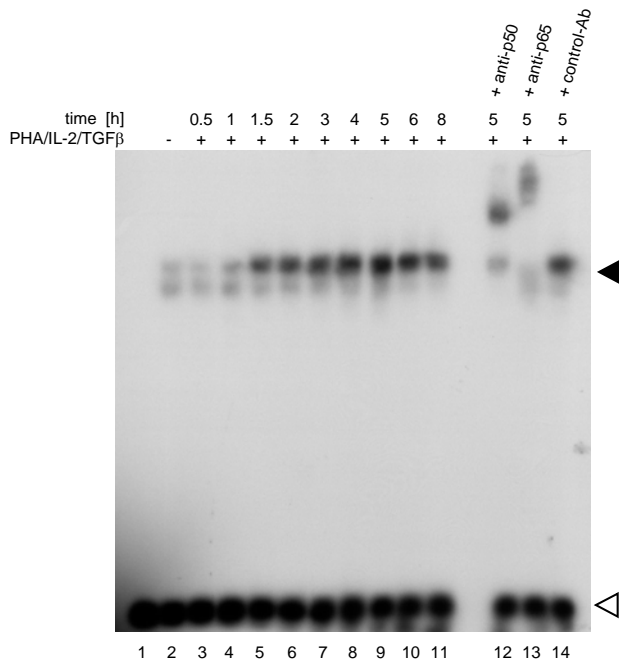


Abb. 27 PHA/IL-2/TGFβ induziert die NF-κB DNA-Bindung in humanen T-Zellen

Hochgereinigte T-Zellen wurden mit PHA (1 µg/ml), IL-2 (100 U/ml) und TGFβ (50 ng/ml) stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulationsbeginn (0 – 8h) wie in Material und Methodik beschrieben isoliert und auf ihre NF-κB bindende Aktivität unter Verwendung eines spezifischen ³²P-markierten Oligonukleotids untersucht. Der NF-κB DNA Komplex ist durch ein gefülltes Dreieck markiert, das leere Dreieck zeigt die Position der ungebundenen DNA-Probe. Eine verstärkte NF-κB DNA Bindung wurde nach 60 Minuten beobachtet und erreichte ihr Maximum nach ca. 4 – 5h. Der PHA/IL-2/TGFβ-induzierte Protein DNA Komplex wurde mittels p50 und p65 spezifischer Antikörper näher charakterisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für eines von drei durchgeführten Experimenten. Aus: *Zollner et al., eingereicht.*

Das Auftreten des NF-κB DNA bindenden Komplexes wurde durch die verwendeten NF-κB Inhibitoren supprimiert. T-Zellen wurden 1h vor Stimulationsbeginn mit den NF-κB Inhibitoren (NAC, Lactacystin, BAY11-7082) vorinkubiert, anschließend wurden die T-Zellen für 4h mit PHA/IL-2/TGFβ stimuliert. Wie erwartet supprimierten NAC (25 mM), Lactacystin (1 – 25 µM) und BAY11-7082 (10 nM – 1 µM) die NF-κB DNA Bindung (**Abb. 28**).

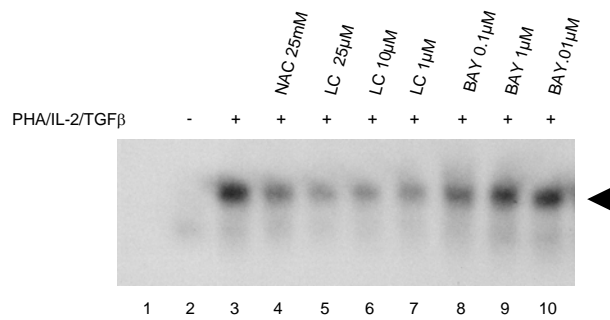


Abb. 28 Der PHA/IL-2/TGF β induzierte NF- κ B DNA Komplex wird durch das Antioxidans NAC, den κ B Phosphorylierungsinhibitor BAY11-7082 und den Proteasomeninhibitor Lactacystin supprimiert.

Hochgereinigte T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β über 4 h stimuliert. NAC (25 mM), Lactacystin (1 – 25 μ M) oder BAY11-7082 (10 nM – 1 μ M) supprimierten die NF- κ B DNA Bindung. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines EMSAs, wobei das gefüllte Dreieck die Position des NF- κ B DNA Komplexes angibt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für eines von drei durchgeführten Experimenten. Aus: Zollner et al., eingereicht.

FucT-VII mRNA wird durch PHA/IL-2/TGF β Stimulation aufreguliert und durch NAC, BAY11-7082 oder Lactacystin inhibiert.

Hochgereinigte T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β für bis zu 144h stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde RNA isoliert und die FucT-VII mRNA Expression untersucht. Wir fanden eine zeitabhängige Induktion der FucT-VII mRNA Expression, die erstmals 24h nach Beginn der Zellstimulation nachweisbar war, nach 48 – 72h ihr Maximum erreichte und danach wieder abnahm (**Abb. 29**). Die maximale CLA-Expression wurde zwischen Tag 4 und Tag 5 beobachtet, d.h. 2 – 3 Tage nach der maximalen FucT-VII mRNA Induktion. Auch die Stimulation von PBMC durch das Superantigen TSST-1 (100 ng/ml) induzierte eine FucT-VII mRNA Expression mit annähernd identischer Kinetik (Daten nicht gezeigt).

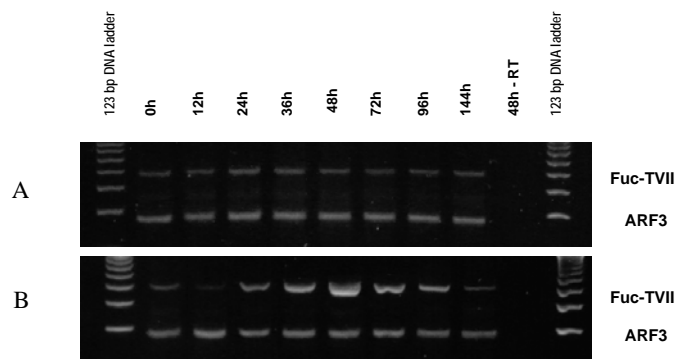


Abb. 29 Aufregulation der FucT-VII mRNA Expression bei PHA/IL-2/TGF β stimulierten im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

T-Zellen wurden mit Medium (A) oder mit PHA/IL-2/TGF β (B) für bis zu 144h kultiviert und anschließend die RNA zu den genannten Zeitpunkten extrahiert. RT-PCR Experimente für FucT-VII (obere Spuren) bzw. für das schwach exprimierte, nicht regulierte Gen ARF3 (untere Spuren) wurden wie in Material und Methodik genannt durchgeführt. RT-PCR Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Desweiteren wurden Experimente in Abwesenheit von Reverser Transkriptase durchgeführt, um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen (nicht dargestellt). Die hier dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Aus: Zollner et al., eingereicht.

Danach untersuchten wir den Einfluß der genannten NF- κ B Inhibitoren (NAC, BAY11-7082, Lactacystin) auf die PHA/IL-2/TGF β medierte FucT-VII mRNA Induktion. NAC (25 mM), BAY11-7082 (1 μ M) und Lactacystin (25 μ M) inhibierten gleichermaßen die FucT-VII mRNA Aufregulation (**Abb. 30**).

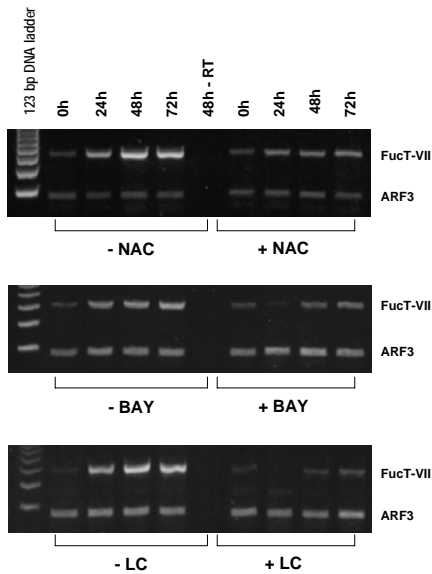


Abb. 30 NF- κ B Inhibitoren supprimieren die PHA/IL-2/TGF β induzierte FucT-VII mRNA Aufregulation.

T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β für bis zu 72h in Ab- oder Anwesenheit von NAC (25 mM), BAY11-7082 (BAY; 1 μ M) oder Lactacystin (LC; 25 μ M) stimuliert und anschließend die RNA zu den genannten Zeitpunkten extrahiert. RT-PCR Experimente für FucT-VII (obere Spuren) bzw. für das schwach exprimierte, nicht regulierte Gen ARF3 (untere Spuren) wurden wie in Material und Methodik genannt durchgeführt. RT-PCR Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Desweiteren wurden Experimente in Abwesenheit von Reverser Transkriptase durchgeführt, um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen (nicht dargestellt). Die hier dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. *Aus: Zollner et al., eingereicht.*

Die T-zelluläre CLA Expression wird durch NAC, BAY11-7082 und Lactacystin inhibiert.

Um zu untersuchen, inwiefern die Hemmung der FucT-VII mRNA Expression mit einer Hemmung der Expression fukosylierter Proteine einhergeht, bestimmten wir die Expression von CLA und CD15s auf T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Hochgereinigte T-Zellen wurden für 5 Tage mit PHA/IL-2/TGF β in An- oder Abwesenheit von NF- κ B Inhibitoren stimuliert. Neben den o.g. wurden bei diesen Versuchen noch ein zusätzlicher Proteasomeninhibitor (MG132) sowie ein weiterer κ B Phosphorylierungsinhibitor (BAY11-7085) verwendet. All die genannten Inhibitoren unterdrückten die T-zelluläre CLA Expression in annähernd gleicher Intensität (**Abb. 31**). Eine Verminderung der CLA-Expression war bei CD3+CD4+

und bei CD3+CD8+ Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Expression von CD15s war nur zu einem geringeren Umfang suppressierbar. Die Expression des Proteinanteils von CLA, PSGL-1, blieb unter diesen Kulturbedingungen unverändert (**Abb. 31**). Um zu untersuchen, inwiefern die beobachteten Effekte spezifisch für den FucT-VII regulierten Rezeptor CLA sind, analysierten wir auch die Expression von Homingrezeptoren, die mit einer Rezirkulation in den Magen-Darm-Trakt assoziiert sind ($\alpha 4\beta 7$, $\alpha E\beta 7$). Die Expression der von BerACT8 und HP2/1 erkannten Epitope (αE bzw. $\alpha 4$) blieben in Anwesenheit der NF- κB Inhibitoren unverändert (Daten nicht gezeigt).

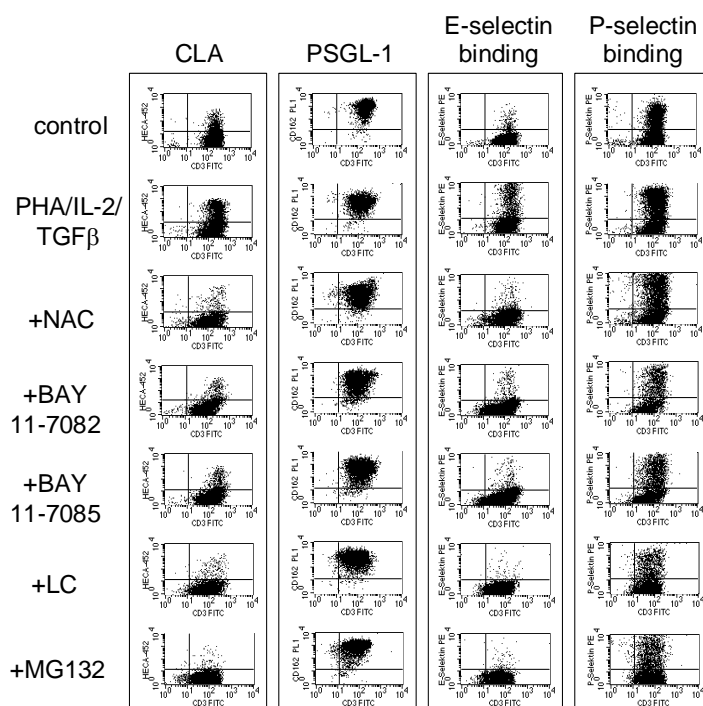


Abb. 31 Die Expression von CLA und PSGL-1 sowie die Bindung an E- und P-Selektin von PHA/IL-2/TGF β stimulierten T-Zellen wird durch NF- κB Inhibitoren supprimiert.

T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β in An- oder Abwesenheit der NF- κB Inhibitoren NAC (25 mM), BAY11-7082 bzw. BAY11-7085 (je 1 μM), Lactacystin (LC; 25 μM) oder MG132 (100 nM) stimuliert. Die Expression von CLA und PSGL-1 sowie die Bindung an E- und P-Selektin wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen. Geeignete Isotyp-Kontrollantikörper dienten zum Ausschluß von unspezifischen Färbungen. Die Daten zeigen ein repräsentatives von 5 Experimenten. Aus: Zollner et al., eingereicht.

In den bisher erwähnten Experimenten untersuchten wir die Expression von CLA in Anwesenheit von NF- κ B Inhibitoren, wobei diese bereits zu Beginn der Stimulation zu den Kulturen gegeben wurden. Da jedoch in vivo eine CLA Aufregulation sicherlich bereits vor der Einleitung von therapeutischen Maßnahmen auftritt, fragten wir uns, inwiefern die CLA-Expression ebenso supprimiert werden kann, wenn diese bereits ihr Maximum erreicht hat. Deswegen gaben wir in weiteren Experimenten NAC entweder zu Beginn der Kultur oder zum Vergleich am Tag 5 zu den Kulturen, also zu einem Zeitpunkt, zu dem eine maximale Aufregulation bereits erreicht ist. NAC inhibierte die CLA-Aufregulation (**Abb. 32**, durchgezogene Linien). Ebenso führte es zu einer Verminderung der CLA Expression, wenn es am Tag 5 zu den Kulturen zugegeben wurde (**Abb. 32**, gestrichelte Linien). Wiederum war die PSGL-1 Expression unverändert und CD15s wurde geringer als CLA (bis zu 60% Hemmung), jedoch signifikant ($p < 0,01$) inhibiert. Somit können wir schließen, daß die CLA Expression nicht nur während der Entstehung des Hautphänotyps inhibiert werden kann, sondern auch noch bei etabliertem Phänotyp.

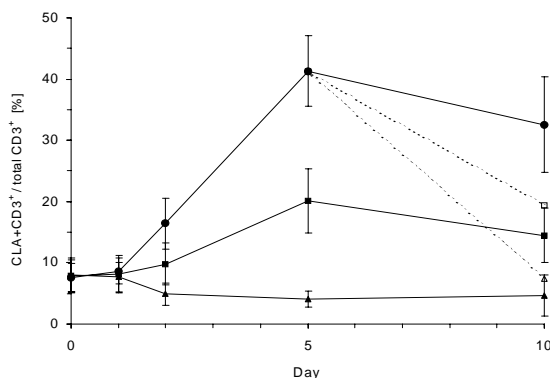


Abb. 32 NAC reduziert die Expression von CLA auf PHA/IL-2/TGF β stimulierten T-Zellen auch nach bereits erfolgter Aufregulation.

T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β in Abwesenheit (•) oder Anwesenheit von NAC (5 mM ■ und 25 mM ▲) für 1 – 10 Tage kultiviert. Dabei wurden folgende Experimente parallel durchgeführt: Zugabe von NAC zu Beginn der Kulturperiode (durchgezogene Linie) oder Zugabe am Tag 5 nach erfolgter CLA-Induktion (gestrichelte Linie, NAC 5 mM □ und 25 mM Δ). Die CLA-Expression wurde zu den genannten Zeiten durchflußzytometrisch bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD von 7 Experimenten. Aus: Zollner et al., eingereicht.

NF- κ B Inhibitoren supprimieren präferentiell die T-Zell E-Selektin Liganden Bindung *in vitro*.

Um die funktionelle Relevanz der supprimierten FucT-VII mRNA und Glykoprotein Expression zu bestimmen, analysierten wir die Bindung von E- und P-Selektin an T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Ruhende oder PHA/IL-2/TGF β stimulierte T-Zellen wurden mit PE-markierten rekombinanten P- bzw. E-Selektin IgG Fusionsproteinen inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der markierten T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Stimulation der T-Zellen führte zu einer annähernd 10-fachen Zunahme der E-Selektin Bindung von T-Zellen. Diese war in gleichem Maße und annähernd vollständig durch NAC, Lactacystin oder BAY11-7082 inhibierbar (**Abb. 33**). Die T-Zell Stimulation führte zu einer etwa 1,7-fachen Zunahme der Bindung des P-Selektin IgG Fusionsproteins. Diese Zunahme war um etwa 50% durch die genannten NF- κ B Inhibitoren reduzierbar (**Abb. 33**).

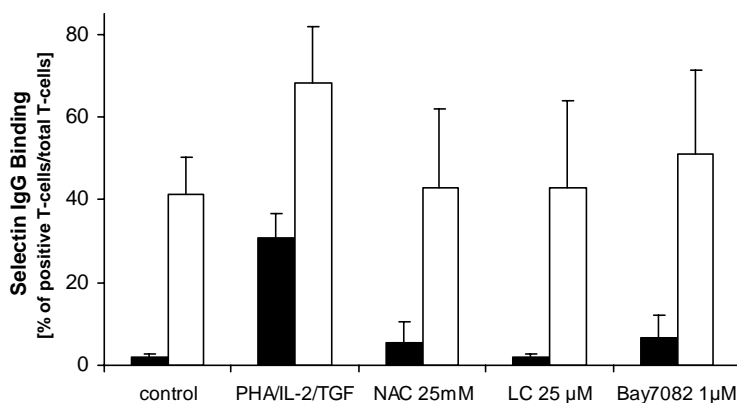


Abb. 33 **NF- κ B** Inhibitoren hemmen präferentiell die T-Zell E-Selektin Bindung *in vitro*.

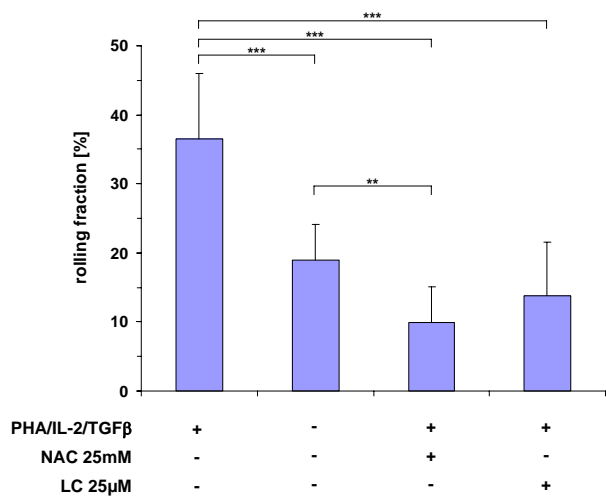
T-Zellen wurden über 5 Tage mit PHA/IL-2/TGF β in An- oder Abwesenheit der NF- κ B Inhibitoren NAC (25 mM), Lactacystin (LC, 25 μ M) oder BAY11-7082 (BAY7082, 1 μ M) stimuliert. Anschließend wurde die E- bzw. P-Selektin Bindung mit Hilfe der Durchflußzytometrie wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Entsprechende Kontrollen schlossen unspezifische Markierung mit den Fusionsproteinen aus. $p < 0,001$ für E-Selektin Bindung von stimulierten versus ruhenden bzw. stimulierten und NF- κ B Inhibitor behandelten Zellen. $p < 0,05$ für P-Selektin Bindung von stimulierten versus ruhenden bzw. stimulierten und NAC oder LC behandelten Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD von 7 Experimenten. Aus: Zollner et al., eingereicht.

Suppression des Rollens von T-Zellen an endothelialen Selektinen in vivo durch NF- κ B Inhibitoren

Die Intravitalmikroskopie ermöglicht die unmittelbare Visualisierung der Interaktion von Leukozyten mit dem postkapillären Endothel von Venolen in vivo. Da humane E- und P-Selektin Liganden mit murinen Selektinen effektiv interagieren, ist es möglich und sinnvoll, die Interaktion von humanen Leukozyten mit murinen Gefäßen zu untersuchen (Robert et al., 1999b). Das Rollen von Leukozyten entlang des Hautendothels wird ausschließlich von P- und E-Selektin mediiert (von Andrian UH, persönliche Mitteilung sowie Weniger et al., in press). Aufgrund unserer in vitro Ergebnisse ist zu erwarten, daß stimulierte und NF- κ B Inhibitor behandelte T-Zellen im Vergleich zu stimulierten Zellen weniger am Endothel rollen. Fluoreszenzmarkierte T-Zellen wurden bei vier Mäusen in die rechte A. carotis communis retrograd in den Aortenbogen injiziert. Die Interaktion dieser Zellen mit dem Endothel postkapillärer Venolen des Mausohres wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie beobachtet. Insgesamt wurden die Interaktionen der T-Zellen mit dem Endothel bei 24 Gefäßen untersucht. Die Zahl der am Endothel rollenden T-Zellen war nach PHA/IL-2/TGF β Stimulation im Vergleich zu ruhenden Zellen etwa verdoppelt (**Abb. 34a**). Die Kultivierung der stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von NAC oder Lactacystin führte zu einer deutlichen Reduktion der Zahl der am Endothel rollenden T-Zellen, diese lag jeweils unter derjenigen der ruhenden T-Zellen (**Abb. 34a**).

Da das Rollen von T-Zellen am nicht-entzündeten Endothel ausschließlich durch konstitutiv exprimiertes E- und P-Selektin mediiert wird (von Andrian UH, persönliche Mitteilung sowie Weniger et al., in press), interessierte uns der jeweilige Anteil der beiden Selektine am T-Zell Rollen. Dazu untersuchten wir parallel das Rollverhalten von Zellen aus identischen Spendern jeweils in P-Selektin defizienten sowie in Wildtyp-Mäusen. Eine Zunahme der Zahl rollender T-Zellen bei stimulierten sowie eine Abnahme durch Behandlung mit den beiden NF- κ B Inhibitoren wurde sowohl in Wildtyp- als auch in P-Selektin $-/-$ Mäusen beobachtet. Die Rollfraktion bei P-Selektin $-/-$ Mäusen war jedoch um etwa die Hälfte niedriger als bei Wildtyp-Mäusen (**Abb. 34b**). Das zeigt, daß sowohl P- als auch E-Selektin für das Rollen von T-Zellen am nicht-entzündeten Endothel der Haut verantwortlich sind.

A



B

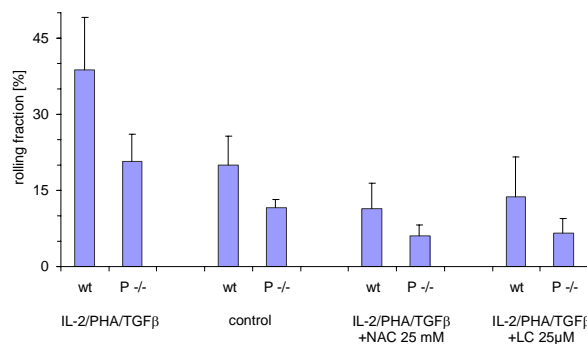


Abb. 34 Das Rollen von PHA/IL-2/TGFβ stimulierten T-Zellen am nicht-entzündeten Endothel der Haut wird durch NF-κB Inhibitoren supprimiert.

A) Nach der in vitro-Kultivierung der T-Zellen (siehe Material und Methoden), wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF markiert und retrograd in die rechte A. carotis communis injiziert. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und die Rollfraktion als Prozentsatz aller markierten, humanen T-Zellen bestimmt. Die Stimulation der T-Zellen mit PHA/IL-2/TGFβ erhöhte die Rollfraktion in Wildtypmäusen und der Anstieg der Rollfraktion wurde durch die NF-κB Inhibitoren NAC (25 mM) und Lactacystin (LC; 25 μM) vollständig blockiert. Die Daten zeigen Mittelwerte±SD von 24 Gefäßen in 4 Wildtypmäusen.

B) Darüber hinaus wurden T-Zellen jeweils von identischen Spendern entweder in Wildtyp- oder in P-Selektin -/- Mäusen injiziert. Die Kulturbedingungen veränderten das Rollverhalten in P-Selektin -/- Mäusen analog zu den Wildtypmäusen. Die Rollfraktion in P-Selektin -/- Mäusen war jedoch im Vergleich zu Wildtypmäusen deutlich niedriger. Die Daten zeigen Mittelwerte±SD von 17 Gefäßen in 3 Wildtypmäusen sowie von 16 Gefäßen in 3 P-Selektin -/- Mäusen. Aus: Zollner et al., eingereicht.

Die Rekrutierung von Gedächtnis T-Zellen in die Haut ist von zentraler Bedeutung für die Immunüberwachung des Hautorgans, aber auch für die Pathogenese von T-Zell medierten Hautkrankheiten. Die Einwanderung wird durch ein komplexes, mehrstufiges Programm reguliert und beginnt mit der Interaktion von endotheliale E- und P-Selektin mit deren Liganden CLA und PSGL-1 auf T-Zellen (Berg et al., 1991a; Subramaniam et al., 1995; Frenette et al., 1996; Tietz et al., 1998; Catalina et al., 1999; Chu et al., 1999). CLA ist das Schlüsselmolekül für die Einwanderung von T-Zellen in die Haut und fördert die folgenden Interaktionen in der Adhäsionskaskade (McEver et al., 1995; Campbell et al., 1999). Aufgrund der Bedeutung von CLA für die Rekrutierung von T-Zellen in die Haut untersuchten wir Substanzen auf ihr Potential, die Invasion von T-Zellen in die Haut zu unterdrücken.

Da einerseits FucT-VII – die Glykosyltransferase, die für die posttranslationale Modifikation von PSGL-1 zu CLA verantwortlich ist – mehrere putative NF- κ B Bindungsstellen besitzt (Hiraiwa et al., 1997) und andererseits die bekannten Induktoren von CLA die Aktivierung von NF- κ B gemeinsam haben (Baeuerle und Henkel, 1994; Hong et al., 1997), untersuchten wir exemplarisch den Effekt von drei verschiedenen Substanzklassen, die die Hemmung der NF- κ B Aktivierung gemeinsam haben, auf die Expression von CLA. Wir fanden, daß (I) ein Antioxidans (NAC), von dem die Hemmung der I κ B Kinase bekannt ist (Spiecker et al., 1998), (II) ein I κ B Phosphorylierungshemmer (BAY11-7082) und (III) ein Proteasomeninhibitor (Lactacystin) die aktivierungsinduzierte FucT-VII mRNA Expression, die CLA Expression sowie seine Funktion in vitro und in vivo inhibieren. Bei allen verwendeten NF- κ B Inhibitoren war die Hemmung der FucT-VII mRNA Expression und der CLA Expression in etwa in der gleichen Größenordnung, wenn von den genannten Substanzen jeweils maximale, nicht-toxische Konzentrationen verwendet wurden. Wir nehmen daher an, daß die Expression und Funktion von FucT-VII bzw. CLA auf molekularer Ebene über den Aktivierungszustand von NF- κ B reguliert werden kann. Da kürzlich allerdings gezeigt wurde, daß die IL-4 oder Oncostatin-M induzierte P-Selektin Expression durch NF- κ B Inhibitoren über NF- κ B unabhängige Mechanismen reguliert werden kann (Xia et al., 1998), können wir dies bei unseren Untersuchungen nicht prinzipiell ausschließen. Allerdings ist dies insofern unwahrscheinlich, als bei den Untersuchungen von Xia et al. weder durch IL-4 noch durch Oncostatin-M eine NF- κ B Aktivierung im EMSA nachweisbar war. Bei unseren Untersuchungen fand sich jedoch durch die T-Zell Stimulation eine deutliche

Aktivierung von NF- κ B, welche durch die NF- κ B Inhibitoren vermieden werden konnte.

Da FucT-VII für die Bildung von E- und P-Selektin Liganden verantwortlich ist (Maly et al., 1996; Wagers et al., 1996), sollte eine Hemmung von FucT-VII in einer verminderten Bindung von T-Zellen an E- und P-Selektin resultieren. Tatsächlich führte die Stimulation von T-Zellen in Anwesenheit der NF- κ B Inhibitoren zu einer verminderten Bindung von T-Zellen an E- und P-Selektin, wie wir mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachweisen konnten. Allerdings wurde die in vitro E-Selektin Bindung deutlich stärker als die E-Selektin Bindung beeinflusst. Trotz dieser Unterschiede in vitro fanden wir in vivo eine annähernd gleiche Beteiligung von E- und P-Selektin für das Rollen von T-Zellen am Hautendothel in vivo. Bei P-Selektin defizienten Mäusen war E-Selektin ausreichend, um das Rollen von T-Zellen am nicht entzündeten Endothel des Mausohres aufrechtzuerhalten, allerdings war die Rollfraktion um etwa 50% reduziert. Dies ist annähernd mit Experimenten von Weniger et al. vergleichbar, die eine etwa 70%ige Reduktion in P-Selektin Mäusen, allerdings eine nur etwa 30%ige Reduktion in E-Selektin Mäusen fanden (Weniger et al., in press sowie von Andrian UH, persönliche Mitteilung). Die Rollgeschwindigkeit, die in unseren Experimenten nicht bestimmt wurde, war bei P-Selektin defizienten Mäusen dagegen nur gering, bei E-Selektin defizienten Mäusen allerdings dramatisch erhöht (Weniger et al., in press). Somit scheint die Interaktion von P-Selektin mit T-Zellen für das initiale Abbremsen der T-Zellen (Tethering) und die Effizienz des Rollens verantwortlich zu sein, wohingegen E-Selektin mehr für die Qualität der Interaktion und die Rollgeschwindigkeit verantwortlich ist (von Andrian UH, persönliche Mitteilung).

Die Bedeutung der Leukozyten-Migration ist für die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen unumstritten (Tang et al., 1996; Lowe und Ward, 1997). Auch bei der Psoriasis konnte nachgewiesen werden, daß aktivierte T-Zellen für die Induktion der Erkrankung ausreichend sind (Wrone-Smith und Nickoloff, 1996; Schön et al., 1997; Nickoloff und Wrone-Smith, 1999). Für die Induktion der Erkrankung durch Haut-infiltrierende T-Zellen ist jedoch ein erkrankungsprädisponierender genetischer Faktor mit entscheidend (Boehncke et al., 1996). Wir untersuchten potentiell regulatorische Mechanismen der Interaktion von Haut-infiltrierenden T-Zellen mit dem Endothel von postkapillären Venolen der murinen Haut. Dabei reduzierten NF- κ B Inhibitoren die potentiell erkrankungsinitiierenden Interaktionen von T-Zellen mit

dem Hautendothel. NF- κ B regulierte Prozesse sind für die T-Zell – Endothelzell Interaktion von großer Bedeutung (Robert und Kupper, 1999). Wir konnten hier die Rolle von NF- κ B um einen weiteren, zentralen Punkt erweitern, insofern dieser nukleäre Transkriptionsfaktor die Expression von FucT-VII und CLA reguliert.

3.4.2 FK506 und Cyclosporin A hemmen die CLA-Expression und Funktion

Zahlreiche entzündliche Dermatosen wie z.B. die Psoriasis vulgaris oder die atopische Dermatitis können erfolgreich mit lokalen oder systemischen Immunsuppressiva therapiert werden. Zu der derzeit am häufigsten verwendeten Substanzklasse zählen Glukokortikosteroide, darüber hinaus wird Cyclosporin A (CsA) zunehmend häufiger eingesetzt. Neuere Immunsuppressiva wie FK506 (Tacrolimus) sind ebenfalls sehr erfolgreich und stehen in der Bundesrepublik unmittelbar vor der Zulassung.

Glukokortikosteroide zählen zu den potentesten antiinflammatorischen und immunsuppressiven Medikamenten. Sie inhibieren die Synthese beinahe aller bekannter Zytokine und zahlreicher immunologisch bedeutsamer Oberflächenproteine. Der exakte Wirkmechanismus ist allerdings weiterhin nicht vollständig geklärt. Glukokortikosteroide binden im Zytoplasma an lösliche Steroidhormon-Rezeptoren und der dadurch entstehende Hormon-Rezeptor-Komplex kann in den Zellkern translozieren und dort die Expression von Zielgenen modifizieren. Dabei wird die Expression von Zielgenen entweder supprimiert, wie z.B. die des IL-2 Gens, oder induziert, wie z.B. die der Kollagenase I oder die von I κ Ba. Man nimmt an, daß (I) die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen durch die Bindung des Steroidhormon-Rezeptor-Komplexes an positive Glukokortikosteroid Response Elements (GRE) erfolgt, daß (II) eine transkriptionelle Repression über negative GREs erfolgt und daß (III) der Steroidhormon-Rezeptor-Komplex mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B, AP-1 oder CREB interferieren kann (Karin, 1998). Aufgrund (I) der Hemmung der NF- κ B Aktivierung durch Glukokortikosteroide durch eine Induktion der I κ Ba Transkription in lymphoiden Zellen sowie der beschriebenen I κ Ba-unabhängigen Hemmung der NF- κ B Aktivierung (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995; Heck et al., 1997), (II) der enormen Wirksamkeit von Glukokortikosteroiden bei T-Zell medierten Dermatosen (Sterry, 1992; Hunziker, 1997; Trozak, 1999) sowie (III) der oben nachgewiesenen Bedeutung von NF- κ B für die Rekrutierung von T-Zellen in die Haut, fragten wir uns, inwiefern Glukokortikosteroide ihre Wirkung auch über eine Hemmung der T-Zell Migration in die Haut entfalten.

Außerdem interessierten wir uns für die Wirkung zweier weiterer dermatologisch relevanter Immunsuppressiva auf die CLA-Expression und –Funktion, nämlich der

Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 (Liu et al., 1991). Eine T-Zell Aktivierung über den T-Zell Rezeptor resultiert in einem Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} . Dieses bindet an Calmodulin und aktiviert die Phosphatase Calcineurin. Diese dephosphoryliert Mitglieder der NF-AT Familie im Zytoplasma (NF-ATc), die dann in den Zellkern translozieren und mit Mitgliedern der NF-ATn Familie (z.B. AP1) einen Komplex bilden, der an die Promotorregion zahlreicher immunologisch bedeutsamer Gene bindet und die Transkription dieser Gene induziert. Zu diesen Genen gehört u.a. IL-2, TNF- α oder das kostimulatorische Molekül CD40. Sowohl CsA als auch FK506 (Tacrolimus) binden nach ihrer Penetration in die Zellen an ihre zytoplasmatischen Bindungsproteine (Cyclophilin (CyP) bzw. FK506 Bindungsprotein (FKBP)). Der Komplex aus CyP/CsA bzw. FKBP/FK506 hemmt die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin und somit die Translokation von NF-ATc in den Zellkern, was die transkriptionelle Aktivierung o.g. Gene verhindert (Hamilton und Steiner, 1998; Crabtree, 1999; Ruzicka et al., 1999; Zollner, im Druck).

Cyclosporin A und FK506 hemmen die PHA/IL-2/TGF β induzierte FucT-VII mRNA Induktion.

Als erstes untersuchten wir, inwiefern die genannten Substanzen die Expression der FucT-VII mRNA inhibieren. Hochgereinigte T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β in Ab- oder Anwesenheit der folgenden Immunsuppressiva für 48h stimuliert: CsA (1 μM), FK506 (100 nM) und Dexamethason (1 μM – 1 mM). Dexamethason wurde entweder 1h oder 12h vor Stimulationsbeginn den Kulturen zugegeben, da eine Induktion von I κ Ba durch Dexamethason nach 12 h beschrieben ist (Scheinman et al., 1995). Als Kontrolle wurde NAC (25 mM) verwendet. FK506 und CsA hemmten die aktivierungsinduzierte FucT-VII mRNA Expression bis zur Nachweisgrenze, wohingegen Dexamethason sowohl bei 1 stündiger als auch bei 12 stündiger Vorinkubation in keiner der untersuchten Konzentrationen eine deutliche Hemmung der aktivierungsinduzierten FucT-VII mRNA Expression bewirkte (**Abb. 35**).

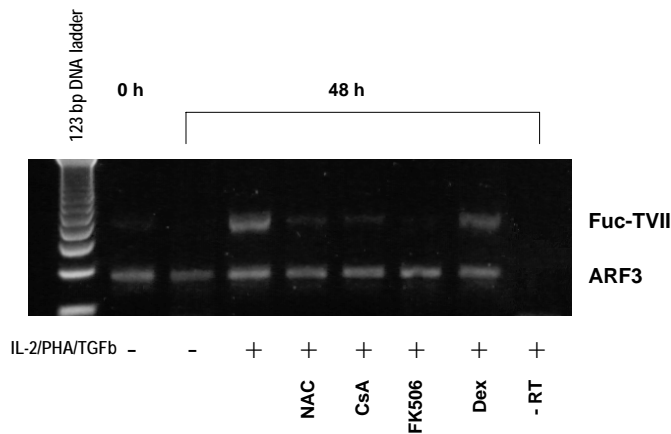


Abb. 35 Cyclosporin A und FK506 hemmen die PHA/IL-2/TGF β induzierte FucT-VII mRNA Induktion.

T-Zellen wurden mit PHA/IL-2/TGF β für 48h in Ab- oder Anwesenheit von NAC (25 mM), Cyclosporin A (CsA; 1 μ M), FK506 (100 nM) oder Dexamethason (Dex; 1 mM) stimuliert und anschließend die RNA extrahiert. RT-PCR Experimente für FucT-VII (obere Spuren) bzw. für das schwach exprimierte, nicht regulierte Gen ARF3 (untere Spuren) wurden wie in Material und Methodik genannt durchgeführt. RT-PCR Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Desweiteren wurden Experimente in Abwesenheit von Reverser Transkriptase (-RT) durchgeführt, um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. Die hier dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. *Aus: Ludwig et al., eingereicht.*

Cyclosporin A und FK506 hemmen die PHA/IL-2/TGF β induzierte CLA-Induktion und -Funktion.

Hochgereinigte T-Zellen wurden über 5 Tage mit PHA/IL-2/TGF β in Ab- oder Anwesenheit von CsA (1 nM – 1 μ M), FK506 (10 pM - 100 nM) oder Dexamethason (100 nM – 1 μ M) stimuliert. Anschließend wurde die Expression und in vitro Funktion des FucT-VII regulierten Glykoproteins CLA durchflußzytometrisch gemessen. Experimente in Anwesenheit von NAC (25 mM) wurden als Kontrolle aufgrund der in 3.4.1 erzielten Ergebnisse mitgeführt. Wir fanden eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der CLA-Expression in Anwesenheit von CsA ($p < 0,05$ für CsA 1 μ M - 0,01 μ M jeweils versus IL-2/PHA/TGF β -Stimulation) und FK506 ($p < 0,05$ für FK506 100 nM – 100 pM jeweils versus IL-2/PHA/TGF β -Stimulation; **Abb. 36**). Für Dexamethason fanden sich lediglich signifikante Effekte bei Konzentrationen $\geq 1 \mu$ M,

was pharmakologisch bei systemischer Anwendung keine Bedeutung besitzt. Die Expression des Proteinanteils von CLA, PSGL-1, blieb durch die genannten Immunsuppressiva unverändert (Daten nicht gezeigt).

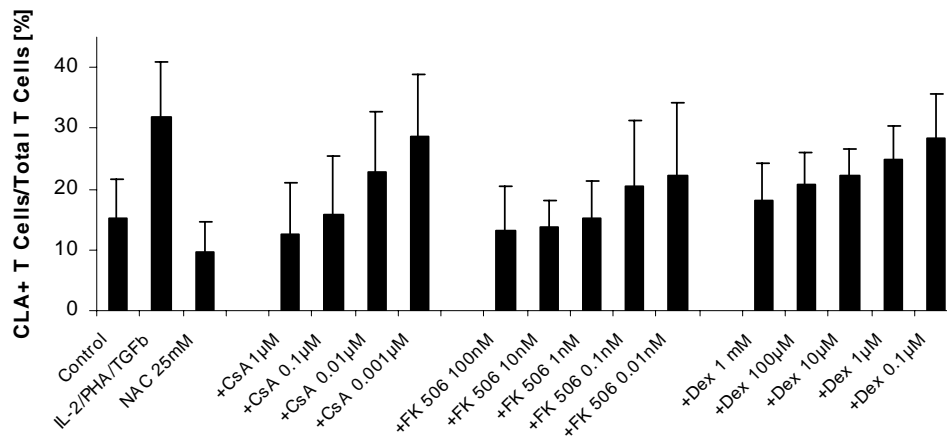


Abb. 36 Cyclosporin A und FK-506 hemmen die PHA/IL-2/TGFβ induzierte CLA-Induktion.

T-Zellen wurden über 5 Tage mit PHA/IL-2/TGFβ in An- oder Abwesenheit von CsA (1 nM – 1 µM), FK506 (10 pM – 100 nM) bzw. Dexamethason (Dex; 100 nM – 1 mM) stimuliert. Die Expression von CLA wurde mittels Durchflußzytometrie gemessen. Geeignete Isotyp-Kontrollantikörper dienten dem Ausschluß unspezifischer Bindungen. Die Daten stellen die Mittelwerte±Standardabweichung von 5 Experimenten dar. Aus: Ludwig et al., eingereicht.

Die Reduktion der CLA-Expression war auch funktionell von Relevanz. So inhibierten CsA und FK506 hochsignifikant die Bindung der T-Zellen an ein rekombinantes E-Selektin IgG Fusionsprotein. Auch Dexamethason hemmte die aktivierungsinduzierte Bindung der T-Zellen an E-Selektin, jedoch in geringerem Ausmaß und lediglich bei deutlich höheren Konzentrationen. Die aktivierungsinduzierte Zunahme der P-Selektin Bindung wurde lediglich durch FK506 (100 nM) signifikant reduziert ($p < 0,05$). Das Ausmaß der FK506-medierten Hemmung der P-Selektin Bindung war jedoch deutlich geringer als die Hemmung der E-Selektin Bindung (**Abb. 37**).

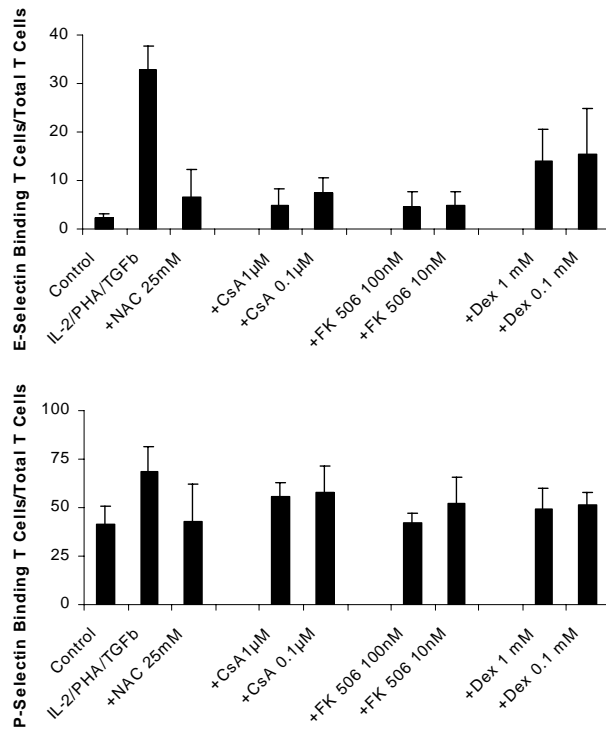


Abb. 37 Cyclosporin A und FK-506 hemmen präferentiell die PHA/IL-2/TGFβ induzierte E-Selectin Bindung.

T-Zellen wurden über 5 Tage mit PHA/IL-2/TGFβ in An- oder Abwesenheit von NAC (25 mM), Cyclosporin A (CsA; 0,1 – 1 μM), FK506 (10 – 100 nM) oder Dexamethason (Dex; 0,1 – 1 mM) stimuliert. Anschließend wurde die E- bzw. P-Selektin Bindung mit Hilfe der Durchflußzytometrie wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Entsprechende Kontrollen schlossen unspezifische Markierung mit den Fusionsproteinen aus. $p < 0,001$ für E-Selektin Bindung von stimulierten versus ruhenden bzw. stimulierten und CsA- bzw. FK506 behandelten Zellen (jeweils für beide Konzentrationen). $p < 0,05$ für E-Selektin Bindung von stimulierten versus stimulierten und Dexamethason-behandelten Zellen (jeweils für beide Konzentrationen). $p < 0,05$ für P-Selektin Bindung von stimulierten versus ruhenden bzw. stimulierten und NAC- bzw. FK506 (100 nM) behandelten Zellen. Die übrigen Ergebnisse waren n.s. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD von 5 Experimenten. Aus: Ludwig et al., eingereicht.

FK-506 hemmt das Rollverhalten von PHA/IL-2/TGFβ stimulierten T-Zellen an den postkapillären Venolen des Mausohres.

Aufgrund unserer in vitro Ergebnisse ist zu erwarten, daß stimulierte und FK506-behandelte T-Zellen im Vergleich zu stimulierten Zellen weniger am Endothel rollen.

Wie in 3.4.1 bereits beschrieben, wurden fluoreszenzmarkierte T-Zellen wurden bei drei Mäusen injiziert und die Interaktion der injizierten Zellen mit dem Endothel mit Hilfe der Intravitalmikroskopie beobachtet. Insgesamt wurden die Interaktionen der T-Zellen mit dem Endothel bei 14 Gefäßen untersucht. Die Zahl der am Endothel rollenden T-Zellen war nach PHA/IL-2/TGF β -Stimulation im Vergleich zu ruhenden Zellen knapp verdreifacht (**Abb. 38**). Die Kultivierung der stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von FK506 führte zu einer signifikanten Reduktion der Zahl der am Endothel rollenden T-Zellen ($p < 0,05$), sie lag etwas über derjenigen der ruhenden T-Zellen (**Abb. 38**).

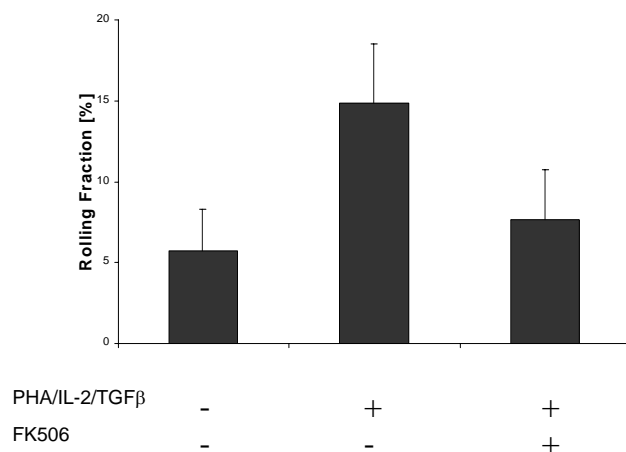


Abb. 38 FK-506 hemmt das Rollverhalten von PHA/IL-2/TGF β stimulierten T-Zellen an den postkapillären Venolen des Mausohres.

Nach in vitro-Kultivierung der T-Zellen (siehe Material und Methoden), wurden sie mit BCECF markiert und retrograd in die rechte A. carotis communis injiziert. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und die Rollfraktion als Prozentsatz aller markierter, humaner T-Zellen bestimmt. Die Stimulation der T-Zellen mit PHA/IL-2/TGF β erhöhte die Rollfraktion in C57B/6 Mäusen und der Anstieg der Rollfraktion wurde durch FK506 (100 nM) signifikant und annähernd vollständig blockiert. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD von 14 Gefäßen in 3 C57B/6 Mäusen. $p < 0,05$ für die Rollfraktion stimulierter versus stimulierter und FK506 behandelter T-Zellen. Aus: Ludwig et al., eingereicht.

3.5 Modifikation der CLA Expression und Funktion durch Oligosaccharide auf posttranskriptioneller Ebene

Die Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden ist der erste Schritt in der Kaskade, die für die Extravasation von immunkompetenten Zellen aus dem Blut in periphere Organe erforderlich ist. Ohne diese erste Interaktion, die für das Rollen von T-Zellen am Endothel verantwortlich ist, können die erforderlichen weiteren Interaktionen nicht ablaufen. Deswegen ist die Intervention in diesen ersten Schritt von großem therapeutischem Interesse.

Zahlreiche Strategien wurden unternommen, um diese initiale Interaktion von Leukozyten mit Endothelien zu inhibieren. Zu diesen zählen die Verabreichung der Selektin-Liganden sLe^x oder Konjugate von sLe^x mit rekombinanten Proteinen (Mulligan et al, 1993 und 1999; Kretzschmar et al., 1995; Sprengard et al., 1996). Weiterhin waren in Tiermodellen monoklonale anti-Selektin Antikörper in der Hemmung der Endothelzell – Leukozyten Interaktion erfolgreich (Winn et al., 1993). Die Hemmung von Glykosyltransferasen, die die Kohlenhydratliganden für die Interaktion mit Selektinen bilden, stellt einen weiteren, potentiell erfolgversprechenden Schritt dar, der die Hemmung dieser initialen Interaktion bewirkt. Wie oben dargestellt konnten wir nachweisen, daß eine derartige funktionelle Hemmung mit NF- κ B Inhibitoren oder Immunsuppressiva möglich ist (Zollner et al., Manuskript eingereicht).

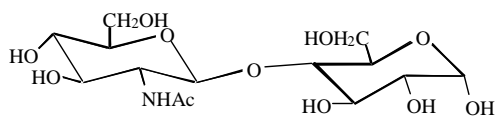
Glykosidische Primer repräsentieren eine weitere Klasse von potentiellen Inhibitoren der Selektin – Selektin-Ligand Interaktion. Sie sind falsche Substrate von Glykosyltransferasen und führen zu falschen Endprodukten, wobei die Glykosyltransferasen die falschen Substrate anstelle der eigentlichen glykosidischen Primer glykosilieren. So inhibiert GalNAc α -O-benzyl³ die O-verknüpfte Glykoproteinsynthese (Kojima et al., 1992). Die Hemmung der Glykoproteinsynthese mit einer derartigen Substanz hemmt bei HL-60 Zellen die sLe^x Synthese (Kojima et al., 1992). Problematisch bei den bisher verwendeten Substanzen war u.a. die geringe Permeabilität der Substanzen und die geringe Spezifität für bestimmte Glykosyltransferasen, da diese Disaccharide oder längere Oligosaccharide als Substrate bevorzugen. Zur Optimierung der Spezifität verwendeten Sarkar et al.

³ Alle Glykoside sind als „Sugar-linked-aglycone“ aufgeführt.

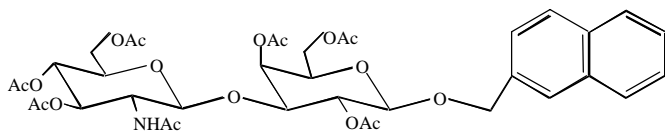
somit Disaccharide. Diese wurden an 2-Naphtol gekoppelt und ihre freien Hydroxylgruppen acetyliert, wodurch die Autoren eine deutlich verbesserte Permeabilität erreichten (Sarkar et al., 1995 und 1997). Wir fragten uns, inwiefern derart modifizierte Disaccharide die Expression und Funktion von CLA bei humanen T-Zellen inhibieren können.

GlcNAc β 1-3Gal-NM hemmt dosisabhängig die Expression der Glykoproteine sLe^x und CLA auf CD3⁺ T-Zellen.

Dazu stimulierten wir humane PBMC mit TSST-1 (100 ng/ml) über 5 Tage in An- oder Abwesenheit von GlcNAc β 1-3Gal-Naphthalenmethanol (1 – 100 μ M) oder mit dem Kontrolloligosaccharid Gal β 1-3GalNAc-Naphthalenmethanol (NM). Während sich das erstgenannte Oligosaccharid vom natürlichen Liganden lediglich durch die unterschiedliche Stellung (β 1-3 statt β 1-4) vom natürlichen Substrat N-Acetyllactosamin unterscheidet (**Abb. 39**), unterscheidet sich das Kontrolloligosaccharid vom natürlichen Substrat zusätzlich noch durch die Komposition des Disaccharids (Gal-Gal statt Glc-Gal). Die Peracetylierung sowie die Bindung an Naphthalenmethanol diente der Verbesserung der Zellpermeabilität und war bei dem untersuchten Oligosaccharid und dem Kontrolloligosaccharid identisch.



GlcNAc β 1,4Gal (N-Acetyllactosamin)



Peracetyliertes GlcNAc β 1,3Gal β -O-NM

Abb. 39 Formeln des natürlichen Substrates (N-Acetyllactosamin) und des CLA-inhibitorischen Disaccharids.

Wir fanden, daß GlcNAc β 1-3Gal-NM die Expression der Glykoproteine sLe^x und CLA auf CD3⁺ T-Zellen dosisabhängig hemmt. Der maximale Effekt wurde bei einer Konzentration des Disaccharids von 100 μ M beobachtet, wohingegen das getestete Kontrolldisaccharid (Peracetyliertes GlcNAc β 1,3Gal β -O-NM) keine derartigen Effekte zeigte. Wie wir anhand des Trypanexklusionstests bzw. der Propidiumjodidaufnahme nachweisen konnten, waren die untersuchten Substanzen in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch. Die minimale, signifikant wirksame Konzentration des Disaccharids lag bei 1 μ M (**Abb. 40**).

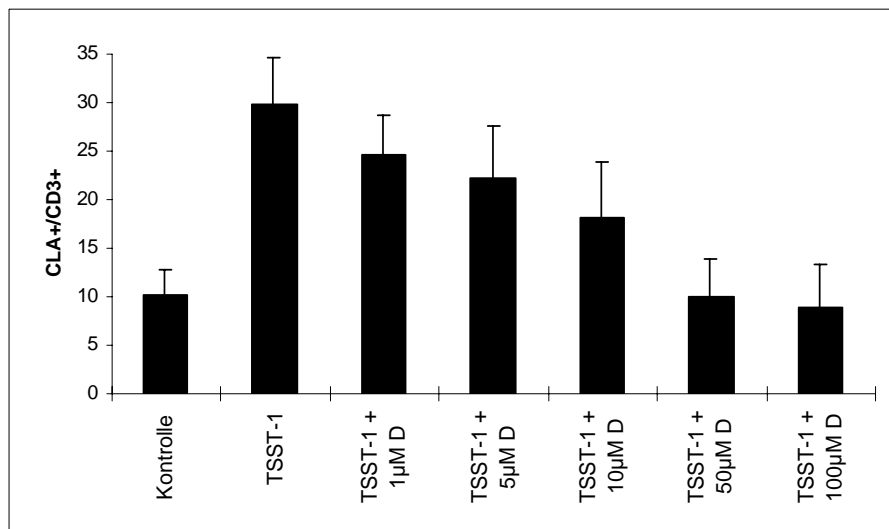


Abb. 40 Die TSST-1 induzierte Aufregulation von CLA wird durch GlcNAc β 1-3Gal β -O-NM dosisabhängig inhibiert.

PBMC wurden mit TSST-1 über 5 Tage in Anwesenheit von GlcNAc β 1-3Gal β -O-NM (0 – 100 μ M) oder dem Kontroll-Disaccharid (Gal β 1-3GalNAc; 0 – 100 μ M) stimuliert, anschließend wurde die Expression des E-Selektin Liganden CLA durchflußzytometrisch bestimmt. n=7, dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. $p < 0,005$ für 100, 50 und 10 μ M des Disaccharids sowie $p < 0,05$ für 5 und 1 μ M des Disaccharids. Das Kontrolldisaccharid Gal β 1-3GalNAc beeinflusste in keiner der genannten Konzentrationen die Expression von CLA (Daten nicht gezeigt). Aus: Podda et al., eingereicht.

GlcNAc β 1-3Gal β -O-NM hemmt dosisabhängig die Expression der Glykoproteine sLe^x und CLA auf CD3⁺ T-Zellen.

Während die Expression der E-Selektin Liganden CLA und sLe^x durch das untersuchte Disaccharid dosisabhängig inhibiert werden, bleibt die Expression des

Proteinanteils dieser Liganden auf T-Zellen in Anwesenheit des untersuchten und des Kontrolldisaccharids unverändert (**Abb. 40 und 41**).

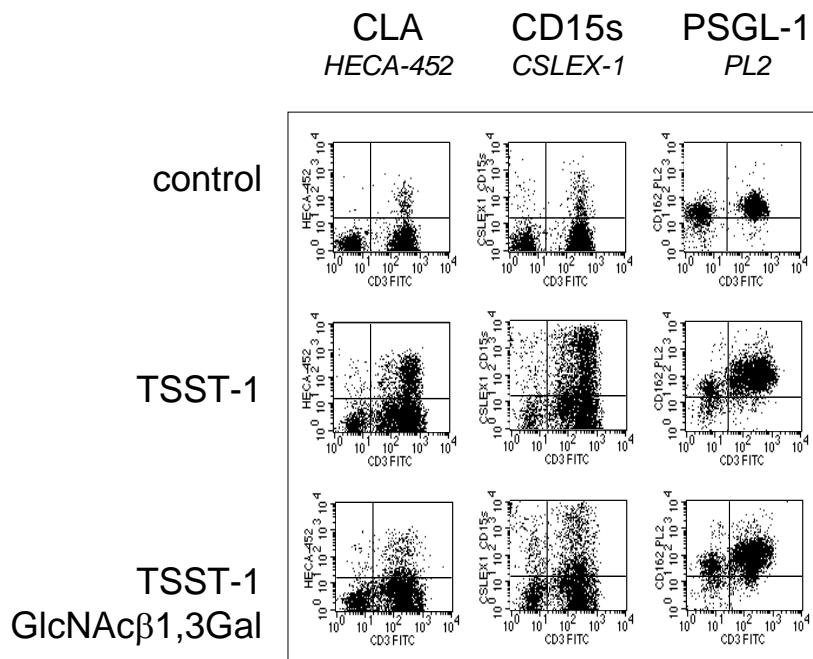


Abb. 41 Die TSST-1 induzierte CLA- und CD15s Expression wird durch GlcNAcβ1,3Gal inhibiert.

PBMC wurden über 5 Tage mit TSST-1 (100 ng/ml) in Ab- oder Anwesenheit von GlcNAcβ1-3Galβ-O-NM (100 μM) oder dem Kontroll-Disaccharid (Galβ1-3GalNAc; 100 μM) stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CLA, CD15s und PSGL-1 durchflußzytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von sieben Experimenten. Aus: Podda et al., eingereicht.

GlcNAcβ1,3Gal-NM hemmt die Bindung von TSST-1 aktivierten PBMC an E-Selektin. PBMC wurden wie oben ausgeführt in Anwesenheit der beiden Disaccharide für 5 Tage stimuliert, anschließend wurde ihre Bindung an E-Selektin in einem statischen E-Selektin Bindungsassay wie in Material und Methodik beschrieben untersucht. Dabei hemmte GlcNAcβ1,3Gal-NM die Bindung von PBMC an E-Selektin dosisabhängig um bis zu 80%, wohingegen das Kontrolldisaccharid keine derartigen Effekte zeigte (**Abb. 42** bzw. Daten nicht gezeigt). Die Bindung an P-Selektin wurde ebenfalls signifikant, jedoch zu einem deutlich geringeren Anteil (maximal bis 40%) inhibiert (Daten nicht gezeigt).

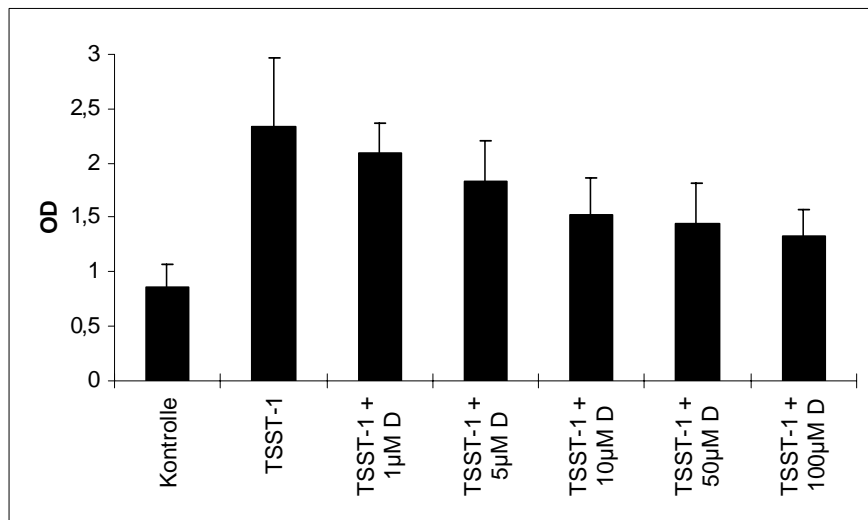


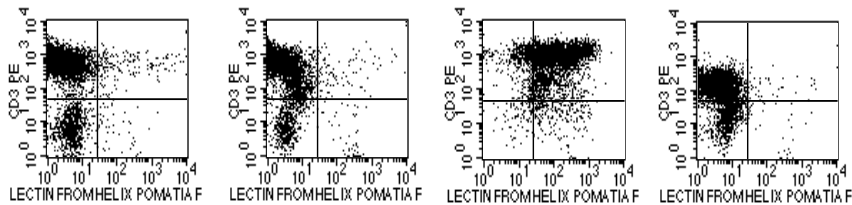
Abb. 42 Die Bindung von TSST-1 stimulierten PBMC an rekombinante E-Selektin IgG Fusionsproteine wird durch GlcNAc β 1,3Gal-NM inhibiert.

PBMC wurden wie oben ausgeführt mit TSST-1 über 5 Tage in Anwesenheit von GlcNAc β 1,3Gal-NM bzw. des Kontrolldisaccharids Gal β 1,3GalNAc-NM stimuliert. Anschließend wurde die Bindung der PBMC an die Festphase in einem statischen E-Selektin Bindungsassay fluorimetrisch untersucht. $n=5$, dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. $p<0,05$ für 100, 50, 10 und 5 μ M des untersuchten Disaccharids. Das Kontrolldisaccharid Gal β 1-3GalNAc beeinflusste in keiner der genannten Konzentrationen die Bindung an E-Selektin (Daten nicht gezeigt). Aus: Podda et al., eingereicht.

Die Hemmung der T-zellulären CLA- bzw. CD15s Expression durch GlcNAc β 1,3Gal-NM ist wahrscheinlich auf eine Synthesehemmung von komplexeren Oligosaccharidseitenketten zurückzuführen.

Die Synthesehemmung komplexer Oligosaccharidseitenketten bewirkt eine Anschoppung von Vorstufen dieser Oligosaccharidseitenketten, die – je nach verwendetem Inhibitor – durchflußzytometrisch mit Hilfe des GalNAc-spezifischen Lektins Helix pomatiaee gemessen werden kann (Kojima et al., 1992). Wir untersuchten daher, ob wir in unserem Modell eine Hemmung der Extension von O-verknüpften Oligosaccharidseitenketten durch das verwendete falsche Substrat nachweisen können. Dazu wurden PBMC mit TSST-1 in Anwesenheit von GlcNAc β 1,3Gal-NM bzw. dem Kontrolloligosaccharid stimuliert, anschließend wurde die Akkumulierung von O-verknüpftem GalNAc mit Hilfe des FITC-konjugierten

Lektins *Helix pomatia* gemessen. Diese korreliert mit der Hemmung der Extension der Glykosierung von Oligosaccharidseitenketten (Kojima et al., 1992). Tatsächlich fanden wir eine deutliche Zunahme der Reaktivität mit dem *Helix pomatia* Lektin auf T-Zellen bei GlcNAc β 1,3Gal-NM behandelten Zellen, nicht jedoch bei Zellen, die mit dem Kontrolloligosaccharid behandelt wurden (**Abb. 42**).



TSST-1	-	+	+	+
GlcNAc β 1,3Gal-NM	-	+	+	-
Gal β 1,3GalNAc-NM	-	-	-	+

Abb. 42 Zunahme der *Helix pomatia* Reaktivität bei GlcNAc β 1,3Gal-NM behandelten PBMC als Zeichen der Hemmung der Oligosaccharidseitenkettenextension.

PBMC wurden mit TSST-1 in Anwesenheit von GlcNAc β 1,3Gal-NM oder des Kontrolloligosaccharids Gal β 1,3GalNAc-NM für 5 Tage stimuliert, anschließend wurde die Reaktivität gegenüber dem GalNAc-spezifischen Lektin *Helix pomatia* durchflußzytometrisch gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von insgesamt fünf durchgeführten Experimenten. Aus: Podda et al., eingereicht.

4. Zusammenfassung

T-Zellen spielen bei der Immunüberwachung der peripheren Organe wie der Haut eine zentrale Rolle. Sie wandern als naive T-Zellen kontinuierlich in großer Zahl in den Paracortex der peripheren Lymphknoten ein. Die Lymphknoten dienen der Konzentration von antigenem Material, das in der Peripherie von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und in die Lymphknoten transportiert wird. Dort treten die Antigen-präsentierenden Zellen in engen, physischen Kontakt mit naiven, Antigen-spezifischen T-Zellen und aktivieren diese. Neben der Aktivierung in diesem definierten anatomischen Kontext kommt es auch zur Aufregulation eines Codes spezifischer Adhäsionsmoleküle, die die Invasion in dasjenige Organ zur Folge hat, aus dem das Antigen drainiert wurde. Dieses organspezifische Rezirkulationsverhalten wird „Homing“ genannt und hat eine optimierte Antigenabwehr zur Folge, da unterschiedliche Antigene typischer Weise mit unterschiedlicher Frequenz in verschiedenen Organen anzutreffen sind.

Beim Kontakt von Antigenen mit der Hautoberfläche produzieren Keratinozyten rasch ein großes Arsenal von Zytokinen, was neben der Emigration und Maturation der Langerhans Zellen eine Aufregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen bewirkt. Für die Initiierung der Einwanderung von T-Zellen in die Haut sind hierbei P- und E-Selektin von wesentlicher Bedeutung, wobei insbesondere E-Selektin nicht nur konstitutiv vom Endothel der Haut exprimiert wird, sondern darüber hinaus auch bei chronischen Entzündungen, wie sie bei atopischer Dermatitis und Psoriasis vulgaris anzutreffen sind, präferentiell von der Haut im Vergleich zu anderen Organen aufreguliert ist. Ligand dieser endothelialen Selektine ist zum einen das konstitutiv von nahezu allen T-Zellen exprimierte Molekül P-Selektin Ligand-1 (PSGL-1), das an P-Selektin bindet. Für die Einwanderung in die Haut ist die Bindung nicht nur an P-Selektin, sondern gleichzeitig auch an E-Selektin essentiell. Ligand von E-Selektin ist das sog. kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen (CLA) sowie das nahe verwandte Epitop CD15s (sialyl Lewis^x), welche beide durch die Aktivität bestimmter Glykosyltransferasen exprimiert werden. Hierbei handelt es sich insbesondere um die $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferase VII (FucT-VII). Die Regulation der FucT-VII und von CLA/CD15s ist somit wichtig für die Fähigkeit von T-Zellen, in die Haut einzuwandern.

Somit sind T-Zellen für eine adäquate Immunüberwachung der Haut von Bedeutung. Es gibt zunehmend auch Hinweise dafür, daß fehlgesteuerte Migrationsprozesse von T-Zellen entzündliche Erkrankungen negativ beeinflussen. Da T-Zellen bei der atopischen Dermatitis und der Psoriasis vulgaris, den beiden häufigsten chronisch-entzündlichen Dermatosen, von zentraler, pathogenetischer Relevanz sind, fragten wir uns, ob typische Induktoren dieser Erkrankungen eine Modifikation des T-Zell Rezirkulationsverhaltens bewirken und inwiefern dieses Rezirkulationsverhalten reguliert wird.

Ziel des ersten Teils der Arbeit war es somit, Auslöser der genannten entzündlichen Dermatosen molekular zu charakterisieren. Ausgehend von der klinischen Beobachtung, daß bakterielle Infektionen bzw. Besiedelung mit Gram-positiven Erregern diesen Erkrankungen vorangehen, wollten wir die Bedeutung von bakteriellen Superantigenen näher untersuchen, da diese Substanzen aufgrund ihrer starken, T-Zell stimulierenden Eigenschaften als Kandidatenmoleküle für die Induktion von T-Zell mediierten Dermatosen in Frage kamen. Dazu etablierten wir für die Psoriasis vulgaris ein xenogenes Transplantationsmodell. Bei diesem wurde humane Haut von gesunden Kontrollen oder perilesionale Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris auf immundefiziente SCID-Mäuse transplantiert. Die repetitive Injektion eines bakteriellen Superantigens induzierte ausschließlich bei Psoriatikern, nicht jedoch bei gesunden Kontrollen, einen psoriatischen Phänotyp. Diese Ergebnisse lassen zwei Schlüsse zu: (I) Ein bakterielles Superantigen ist unter bestimmten Voraussetzungen ausreichend, um eine Psoriasis zu induzieren. (II) Ein bestimmtes, evt. genetisch determiniertes Mikromilieu der Haut ist Voraussetzung für die Induktion der Psoriasis durch das Superantigen.

Um die Bedeutung von Superantigenen bei der atopischen Dermatitis zu untersuchen, analysierten wir die Schwere der atopischen Dermatitis sowie mehrere immunologische Parameter bei Patienten, deren Haut mit Superantigenproduzierenden Staphylokokken besiedelt war, und verglichen diese mit Patienten, deren Haut mit Staphylokokken besiedelt war, die keine Superantigene produzierten. Wir fanden, daß der SCORAD-Index als Maß für die Schwere der atopischen Dermatitis bei der erstgenannten Gruppe signifikant höher war als bei der letztgenannten. Die übrigen klinischen Parameter wie Alter, Geschlecht, Bestandsdauer der Erkrankung waren bei beiden Gruppen nicht signifikant

verschieden. Da bei ca. 80% der Patienten mit atopischer Dermatitis die Gesamt-IgE Konzentration erhöht ist und mit der Schwere der Erkrankung (schwach) korreliert, untersuchten wir diesen Parameter, um auszuschließen, daß eine Patientenselektion für die signifikanten Unterschiede im SCORAD-Index verantwortlich ist. Dabei zeigte sich, daß bei der Patientengruppe, die mit Superantigen-produzierenden Staphylokokken besiedelt war, die Gesamt-IgE Konzentration wider Erwarten signifikant niedriger als bei der Vergleichsgruppe war. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß eine ausgeprägtere atopische Diathese Ursache für die signifikanten Unterschiede im SCORAD-Index sind. Die Ergebnisse dieser Studie legen somit nahe, daß nicht nur bei der Psoriasis vulgaris, sondern auch bei der atopischen Dermatitis bakterielle Superantigene in die Pathogenese involviert sind.

Im zweiten Teil der Arbeit gingen wir der Frage nach, inwiefern Veränderungen des Hautimmunsystems nachweisbar sind, die auf bakterielle Superantigene zurückzuführen sind. In unseren Untersuchungen setzten wir dabei zwei Schwerpunkte: (I) Das T-Zell Rezeptor (TCR) $V\beta$ Repertoire, da Superantigene $\alpha/\beta+$ T-Zellen in TCR $V\beta$ spezifischer Weise aktivieren und (II) Adhäsionsmoleküle unter besonderer Berücksichtigung des Haut-spezifischen Adhäsionsmoleküls CLA, da T-Zell Adhäsionsmoleküle aktivierungsabhängig reguliert werden und eine veränderte T-Zell Migration in pathophysiologische Vorgänge involviert ist. Die Untersuchungen des TCR $V\beta$ Repertoires der Haut erfolgten an der Psoriasis vulgaris als Modell einer T-Zell vermittelten Immundermatose, die – wie oben gezeigt – u.a. durch bakterielle Superantigene induziert werden kann. Im Gegensatz zu Untersuchungen zur „akuten“ Form der Psoriasis, der Psoriasis guttata, bei der Superantigen-medierte Veränderungen des TCR $V\beta$ Repertoires der Haut im Vergleich zum Blut nachgewiesen werden konnten, fanden wir und auch andere Arbeitsgruppen bei der chronisch-stationären Form der Psoriasis keine Veränderungen des TCR $V\beta$ Repertoires der Haut, das für einen Superantigen-medierten Effekt spricht. Aus diesen und anderen Befunden entwickelten wir ein pathophysiologisches Konzept der Psoriasis, bei dem Superantigene zwar in die Induktion, nicht jedoch in die Aufrechterhaltung des Erkrankungsprozesses involviert sind.

Aufgrund der geschilderten Bedeutung der T-Zell Rezirkulation für die Pathogenese T-Zell mediierter Erkrankungen sowie der oben nachgewiesenen Bedeutung von bakteriellen Superantigenen für entzündliche Dermatosen untersuchten wir, ob die

Induktion von T-Zell medierten Erkrankungen der Haut evt. auf eine Aufregulation des Haut-spezifischen Adhäsionsmoleküls CLA zurückzuführen sein könnte. In der Tat induzierten verschiedene bakterielle Superantigene die Expression von CLA auf T-Zellen in vitro. Diese war von funktioneller Relevanz und ist wahrscheinlich auf eine vermehrte Expression der FucT-VII mRNA zurückzuführen. Die Induktion von CLA war spezifisch für Superantigene, da das Mitogen PHA zu keiner wesentlichen Induktion von CLA führte. Da durch TCR V β 2 spezifische Superantigene (ET und TSST-1) CLA nicht nur auf TCR V β 2+ Zellen aufreguliert wurde, vermuteten wir indirekte, evt. Zytokin-medierte Mechanismen, die für die beobachteten Effekte verantwortlich waren. In der Tat wurde von anderen nachgewiesen, daß IL-12 bei Stimulation von PBMC mit Superantigenen von großer Bedeutung für die CLA-Aufregulation ist. Neben peripheren Antigen-präsentierenden Zellen des Blutes waren auch IFN γ -stimulierte, HLA Klasse II+ Keratinozyten in der Lage, Superantigene an T-Zellen zu präsentieren und zu einer CLA-Aufregulation der T-Zellen zu führen. Diese war nahezu vollständig MHC Klasse II abhängig und wurde z.T. durch IL-6 mediert. Auch bei ex vivo Untersuchungen von Patienten mit atopischer Dermatitis fanden wir eine signifikant höhere CLA-Expression auf T-Zellen bei denjenigen Patienten, deren Haut mit Superantigen-produzierenden Staphylokokken besiedelt war. Somit konnten wir nicht nur eine zentrale Bedeutung von bakteriellen Superantigenen für T-Zell medierte Immundermatosen aufzeigen. Wir konnten darüber hinaus auch einen molekularen Mechanismus charakterisieren, der sehr wahrscheinlich in die Induktion bzw. Exazerbation dieser Gruppe von Erkrankungen involviert ist.

Aufgrund der geschilderten Bedeutung von pathologischen Migrationsprozessen für T-Zell medierte Erkrankungen der Haut suchten wir im dritten Teil dieser Arbeit nach Strategien zur Inhibition der T-Zell CLA Expression. Da die bekannten Induktoren von CLA wie Superantigene, anti CD28 oder anti CD3 Stimulation in Anwesenheit von IL-2, Zytokincocktails wie IL-2 und IL-6 bzw. IL-2 und TGF β in Anwesenheit von PHA die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B gemeinsam haben und außerdem NF- κ B Bindungsstellen im Promotor von FucT-VII beschrieben sind, untersuchten wir den Einfluß verschiedener Inhibitoren von NF- κ B auf die FucT-VII mRNA Expression sowie auf die Expression und Funktion von CLA. Als NF- κ B Inhibitoren wählten wir das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein, das die I κ B Kinase

inhibiert, die I κ B Phosphorylierungshemmer Bay11-7082 und Bay11-7085 sowie die Proteasomeninhibitoren Lactacystin und MG132. Alle genannten Substanzen supprimierten in annähernd dem gleichen Umfang die stimulationsinduzierte NF- κ B Aktivierung, FucT-VII mRNA Aufregulation sowie CLA-Expression. Dies war außerdem von funktioneller Bedeutung in vitro und in vivo, wie wir durch eine Hemmung des Rollens von T-Zellen am Endothel des Mausohres mit der Intravitalmikroskopie nachweisen konnten. Somit vermuten wir, daß die Expression und Funktion von CLA auf transkriptioneller Ebene über die Aktivierung von NF- κ B reguliert wird.

Aufgrund der potenten immunsuppressiven Eigenschaften von Glukokortikosteroiden, Cyclosporin A und FK506 untersuchten wir, ob diese Substanzen ebenfalls die Expression von CLA auf T-Zellen inhibieren. Tatsächlich inhibierten Cyclosporin A und FK506 dosisabhängig und nahezu komplett in pharmakologisch relevanten Konzentrationen die aktivierungsinduzierte Aufregulation von FucT-VII sowie der CLA-Expression und –Funktion. Exemplarisch untersuchten wir bei FK506 behandelten T-Zellen auch die CLA-Funktion in vivo: FK506 inhibierte nahezu komplett die aktivierungsinduzierte Zunahme des Rollens von T-Zellen am Endothel des Mausohres. Interessanter Weise hemmte Dexamethason ausschließlich in suprapharmakologischen Konzentrationen und lediglich in geringem Ausmaß die FucT-VII mRNA Expression sowie CLA-Expression und in vitro Funktion. Die molekularen Ursachen für diese differentiellen Effekte der untersuchten Immunsuppressiva sind uns allerdings nicht bekannt.

Da die Elongation von komplexen Oligosaccharidseitenketten an Proteinen wie PSGL-1 von Mono- und Disacchariden ihren Ausgang nimmt, fragten wir uns schließlich, inwiefern Disaccharide, die mit den physiologischen Glykosid-Primern nahezu identisch sind, als „falsche Substrate“ die Glykosilierung von Proteinen und damit die T-Zell Bindung an Selektine beeinflussen. Das dem physiologischen Glykosid-Primer N-Acetyllactosamin (GlcNAc β 1,4Gal) nahe verwandte Disaccharid Galaktosidoglucoamin (GlcNAc β 1,3Gal-NM) hemmte dosisabhängig die T-Zell CLA Expression sowie die Bindung von T-Zellen an E-Selektin IgG Fusionsproteine. Aufgrund des Nachweises einer Anschoppung von kurzkettigen Oligosaccharidseitenketten auf den Zellen vermuten wir, daß für diesen Effekt die Hemmung der Seitenkettenelongation durch die „falschen Substrate“ verantwortlich ist. Somit fanden wir eine Hemmung der Expression und Funktion sowohl auf

transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene. Aufgrund der Bedeutung von fehlgeleiteten Migrationsprozessen stellt die Modulation der T-Zell Migration in die Haut eine untersuchenswerte Strategie zur künftigen Therapie T-Zell mediierter Dermatosen dar.

5. Literatur

Abernathy-Carver KJ, Sampson HA, Picker LJ, Leung DY. Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J Clin Invest* 1995;95:913-918.

Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Goffe BS, Menter A, Lowe NJ, Krueger G, Brown MJ, Weiner RS, Birkhofer MJ, Warner GL, Berry KK, Linsley PS, Krueger JG, Ochs HD, Kelley SL, Kang S. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:1243-1252.

Aiba S, Nakagawa S, Ozawa H, Miyake K, Yagita H, Tagami H. Up-regulation of alpha 4 integrin on activated Langerhans cells: analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes. *J Invest Dermatol* 1993;100:143-147.

Akiyama H, Toi Y, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Prevalence of producers of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 among *Staphylococcus aureus* strains isolated from atopic dermatitis lesions. *Arch Dermatol Res* 1996;288:418-420.

Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994;8:504-512.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Molecular Biology of the Cell*, 3. Auflage, 1994, Garland Publishing, Inc. New York.

Alferink J, Tafuri A, Vestweber D, Hallmann R, Hammerling GJ, Arnold B. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 1998;282:1338-1341.

Allison AC, Monga JN, Hammond V. Increased susceptibility to virus oncogenesis of congenitally thymus-deprived mice. *Nature* 1974;252:746-747.

Anonym. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186:23-31.

Aruffo A, Kolanus W, Walz G, Fredman P, Seed B. CD62/P-selection recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell* 1991;67:35-44.

Arvilommi AM, Salmi M, Kalimo K, Jalkanen S. Lymphocyte binding to vascular endothelium in inflamed skin revisited: a central role for vascular adhesion protein-1 (VAP-1). *Eur J Immunol* 1996;26:825-833.

Auböck J, Romani N, Grubauer G, Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br J Dermatol* 1986;114:465-472.

Augustin M, Dietrich A, Niedner R, Kapp A, Schopf E, Ledbetter JA, Brady W, Linsley PS, Simon JC. Phorbol-12-myristate-13-acetate-treated human keratinocytes express B7-like molecules that serve a costimulatory role in T-cell activation. *J Invest Dermatol* 1993;100:275-281.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995;270:286-290.

Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;385:81-83.

Austyn JM. Lymphoid dendritic cells. *Immunology* 1987;62:161-170.

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-179.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-568.

Baker BS, Swain AF, Fry L, Valdimarsson H. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol* 1984;110:555-564.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-1071.

Becker DJ, Lowe JB. Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:193-204.

Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995;154:1280-1286.

Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991a;174:1461-1466.

Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 1991b;266:14869-14872.

Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-422.

Bianchi AT, Hooijkaas H, Benner R, Tees R, Nordin AA, Schreier MH. Clones of helper T cells mediate antigen-specific, H-2-restricted DTH. *Nature* 1981;290:62-3

Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1961;37:51-64.

Boehncke WH, Sterry W, Hainzl A, Scheffold W, Kaufmann R. Psoriasiform architecture of murine epidermis overlying human psoriatic dermis transplanted onto SCID mice. *Arch Dermatol Res* 1994;286:325-330.

Boehncke WH, Dressel D, Manfras B, Zollner TM, Wettstein A, Bohm BO, Sterry W. T-cell-receptor repertoire in chronic plaque-stage psoriasis is restricted and lacks enrichment of superantigen-associated V beta regions. *J Invest Dermatol* 1995;104:725-728.

Boehncke WH, Dressel D, Zollner TM, Kaufmann R. Pulling the trigger on psoriasis. *Nature* 1996;379:777.

Boehncke WH, Zollner TM, Dressel D, Kaufmann R. Induction of psoriasiform inflammation by a bacterial superantigen in the SCID-hu xenogeneic transplantation model. *J Cutan Pathol.* 1997;24:1-7.

Boehncke WH. Graft persistence in animal models of psoriasis. *Nat Med* 1997;3:702-703.

Boehncke WH, Zollner TM. The role of bacterial superantigens in pathophysiology of the skin. *Hautarzt* 1999;50:91-97.

Boehncke WH, Zollner TM. Die Rolle bakterieller Superantigene für die Pathogenese der Psoriasis. In: Plettenberg A, Meigel WN, Moll I: *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend*. S. 176 – S. 179. Springer Verlag, Berlin, 2000.

Borges E, Pendl G, Eytner R, Steegmaier M, Zollner O, Vestweber D. The binding of T cell-expressed P-selectin glycoprotein ligand-1 to E- and P-selectin is differentially regulated. *J Biol Chem* 1997;272:28786-28792.

Borowitz MJ, Weidner A, Olsen EA, Picker LJ. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. *Leukemia* 1993;7:859-863.

Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1987 88:569-573.

Bos JD und Kapsenberg ML. The skin immune system: Progress in cutaneous biology. *Immunology Today* 1993;14:75-78.

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

Boyera N, Cavey D, Delamadeleine F, Bouclier M, Hensby C, Shroot B. A novel in vitro model for the study of human keratinocyte/leucocyte interactions under autologous conditions. *Br J Dermatol* 1993;129:521-529.

Brasch J, Burgard J, Sterry W. Common pathogenetic pathways in allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 1992;98:166-170.

Brown DW, Baker BS, Ovigne JM, Hardman C, Powles AV, Fry L. Skin CD4+ T Cells Produce Interferon-gamma In Vitro in Response to Streptococcal Antigens in Chronic Plaque Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2000;114:576-580.

Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, Herz U, Bergmann RL, Wahn U, Renz H. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the *Staphylococcus aureus*-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:119-124.

Butcher EC. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;128:85-122.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.

Cahill RN, Frost H, Trnka Z. The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J Exp Med* 1976;143:870-888.

Cahill RN, Poskitt DC, Frost DC, Trnka Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med* 1977;145:420-428.

Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999; 400:776-780.

Catalina MD, Estess P, Siegelman MH. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* 1999;93:580-589.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, Banchereau J. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 1994;6:1177-1185.

Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, Kurland HH, Karasek MA, Wilkinson DI, Carlo DJ. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9282-9286.

Chu A, Hong K, Berg EL, Ehrhardt RO. Tissue specificity of E- and P-selectin ligands in Th1-mediated chronic inflammation. *J Immunol* 1999;163:5086-5093.

Corsini E, Terzoli A, Bruccoleri A, Marinovich M, Galli CL. Induction of tumor necrosis factor-alpha in vivo by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs. *J Invest Dermatol* 1997;108:892-896.

Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 1999;96:611-614.

Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-2102.

Davis RE, Smoller BR. T lymphocytes expressing HECA-452 epitope are present in cutaneous acute graft-versus-host disease and erythema multiforme, but not in acute graft-versus-host disease in gut organs. *Am J Pathol* 1992;141:691-698.

de Vries IJ, Langeveld-Wildschut EG, van Reijssen FC, Bihari IC, Bruijnzeel-Koomen CA, Thepen T. Nonspecific T-cell homing during inflammation in atopic dermatitis: expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen and integrin alphaE beta7 on skin-infiltrating T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:694-701.

Duijvestijn AM, Horst E, Pals ST, Rouse BN, Steere AC, Picker LJ, Meijer CJ, Butcher EC. High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *Am J Pathol* 1988;130:147-155.

Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:714-723.

Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 1996;14:155-177.

Enk AH, Katz SI. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992a;89:1398-402.

Enk AH, Katz SI. Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J Invest Dermatol*. 1992b;99:39S-41S.

Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol*. 1993;151:2390-2398.

Enk AH, Katz SI. Contact sensitivity as a model for T-cell activation in skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:80S-83S.

Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni-Baruch R. Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 1992 Dec;327:1789-1792.

Fleischer B, Bailey CJ. Recombinant epidermolytic (exfoliative) toxin A of *Staphylococcus aureus* is not a superantigen. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1992;180(6):273-8.

Ford WL. Lymphocyte migration and immune responses. *Prog Allergy* 1975;19:1-59.

Foster CA, Yokozeki H, Rappersberger K, Koning F, Volc-Platzer B, Rieger A, Coligan JE, Wolff K, Stingl G. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med* 1990;171:997-1013.

Frelinger JG, Hood L, Hill S, Frelinger JA. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 1979;282:321-323.

Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 1996;84:563-574.

Friedmann PS, Strickland I, Memon AA, Johnson PM. Early time course of recruitment of immune surveillance in human skin after chemical provocation. *Clin Exp Immunol*. 1993;91:351-356.

Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997;389:978-981.

Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1990;126:1523.

Gaspari AA, Katz SI. Induction and functional characterization of class II MHC (Ia) antigens on murine keratinocytes. *J Immunol* 1988;140:2956-2963.

Genevee C, Diu A, Nierat J, Caignard A, Dietrich PY, Ferradini L, Roman-Roman S, Triebel F, Hercend T. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 1992;22:1261-1269.

Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995 Sep;16(9):449-457.

Gocinski BL, Tigelaar RE. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol* 1990;144:4121-4128.

Goebeler M, Roth J, Brocker EB, Sorg C, Schulze-Osthoff K. Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J Immunol.* 1995;155:2459-2467.

Goelz SE, Hession C, Goff D, Griffiths B, Tizard R, Newman B, Chi-Rosso G, Lobb R. ELFT: a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand. *Cell* 1990;63:1349-1356.

Goetz DJ, Greif DM, Ding H, Camphausen RT, Howes S, Comess KM, Snapp KR, Kansas GS, Luscinskas FW. Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol* 1997;137:509-519.

Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2)

suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1995;1:442-447.

Gowans JL, McGregor DD. The immunological activities of lymphocytes. *Prog Allergy* 9:1-78, 1965.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662-675.

Grewe M, Walther S, Gyufko K, Czech W, Schopf E, Krutmann J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1995;105:407-410.

Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998;19:359-361.

Hall BL, Finn OJ. PCR-based analysis of the T-cell receptor V beta multigene family: experimental parameters affecting its validity. *Biotechniques* 1992;13:248-257.

Hall JG, Parry DM, Smith ME. The distribution and differentiation of lymph-borne immunoblasts after intravenous injection into syngeneic recipients. *Cell Tissue Kinet* 1972;5:269-281.

Hamann A, Thiele HG. Molecules and regulation in lymphocyte migration. *Immunol Rev* 1989;108:19-44.

Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994;152:3282-3293.

Hamilton GS, Steiner JP. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem* 1998;41:5119-5143.

Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099-1112.

Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1980;92:44-47.

Hauser C, Wuethrich B, Matter L, Wilhelm JA, Sonnabend W, Schopfer K. Staphylococcus aureus skin colonization in atopic dermatitis patients. *Dermatologica* 1985;170:35-39.

Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1997;16:4698-4707.

Henderson CA, Highet AS. Acute psoriasis associated with Lancefield Group C and Group G cutaneous streptococcal infections. *Br J Dermatol* 1988;118:559-561.

Herz U, Schnoy N, Borelli S, Weigl L, Kasbohrer U, Daser A, Wahn U, Kottgen E, Renz H. A human-SCID mouse model for allergic immune response bacterial superantigen enhances skin inflammation and suppresses IgE production. *J Invest Dermatol* 1998;110:224-231.

Heufler C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 1988;167:700-705.

Hiraiwa N, Hiraiwa M, Kannagi R. Human T-cell leukemia virus-1 encoded Tax protein transactivates alpha 1-->3 fucosyltransferase Fuc-T VII, which synthesizes sialyl Lewis X, a selectin ligand expressed on adult T-cell leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:183-186.

Hofer MF, Lester MR, Schlievert PM, Leung DY. Upregulation of IgE synthesis by staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1218-1227.

Hofer MF, Harbeck RJ, Schlievert PM, Leung DY. Staphylococcal toxins augment specific IgE responses by atopic patients exposed to allergen. *J Invest Dermatol* 1999;112:171-176.

Hong YH, Peng HB, La Fata V, Liao JK. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF-beta1. *J Immunol* 1997;159:2418-2423.

Hunziker T. Atopische Dermatitis. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127:390-394.

Hynes RO, Wagner DD. Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice. *J Clin Invest* 1996;98:2193-2195.

Ikuta K, Uchida N, Friedman J, Weissman IL. Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol* 1992;10:759-783.

Inaba K, Romani N, Steinman RM. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell-proliferative responses to dendritic cells. *J Exp Med* 1989;170:527-542.

Jappe U, Heuck D, Witte W, Gollnick H. Superantigen production by *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: no more than a coincidence? *J Invest Dermatol* 1998;110:844-846.

Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1993;36:137-146.

Kalish RS, Johnson KL. Enrichment and function of urushiol (poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol. *J Immunol* 1990;145:3706-3713.

Kampgen E, Koch N, Koch F, Stoger P, Heufler C, Schuler G, Romani N. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3014-3018.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-3287.

Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998;93:487-490.

Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 2000;12:85-98.

Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW, Wiedermann CJ, Tilg H. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol* 1999;163:3232-3238.

Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979;282:324-326.

Kimber I, Cumberbatch M. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J Invest Dermatol* 1992;99:48S-50S.

Kindred B. Rejection of skin grafts from different inbred strains by nude mice reconstituted with allogeneic or congenic thymus cell suspensions. *Eur J Immunol* 1974;4:388-399.

Klareskog L, Tjernlund U, Forsum U, Peterson PA. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 1977;268:248-250.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:505-520.

Koch F, Heufler C, Kampgen E, Schneeweiss D, Bock G, Schuler G. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation. *J Exp Med* 1990;171:159-171.

Kojima N, Handa K, Newman W, Hakomori S. Multi-recognition capability of E-selectin in a dynamic flow system, as evidenced by differential effects of sialidases and anti-carbohydrate antibodies on selectin-mediated cell adhesion at low vs. high wall shear stress: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1686-1694.

Kretzschmar G, Sprengard U, Kunz H, Bartnik E, Schmidt W, Töpfer A, Hörsch B, Krause M, Seiffge D. Oligosaccharide recognition by selectins: Synthesis and biological activity of multivalent sialyl Lewis-X ligands. *Tetrahedron* 1995;51:13015-13030.

Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990;145:2833-2838.

Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Heftler NS, Austin LM, Gottlieb AB. Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. *J Exp Med* 1995;182:2057-2068.

Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1868;44:325-338.

Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994 ;152:5208-5219.

Lechleitner S, Kunstfeld R, Messeritsch-Fanta C, Wolff K, Petzelbauer P. Peripheral lymph node addressins are expressed on skin endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1999;113:410-414.

Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998;397-403.

Lester MR, Hofer MF, Renz H, Trumble AE, Gelfand EW, Leung DY. Modulatory effects of staphylococcal superantigen TSST-1 on IgE synthesis in atopic dermatitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:332-338.

Leung DY, Pober JS, Cotran RS. Expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in elicited late phase allergic reactions. *J Clin Invest* 1991;87:1805-1809.

Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, Hanifin JM, Sampson HA. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 1993a;92:1374-1380.

Leung DY, Walsh P, Giorno R, Norris DA. A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1993b;100:225-228.

Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995a;181:747-753.

Leung DY, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, Kazemi LV, Kim MH, Trumble AE, Kotb M. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest* 1995b;96:2106-2112.

Leung DY, Hauk P, Strickland I, Travers JB, Norris DA. The role of superantigens in human diseases: therapeutic implications for the treatment of skin diseases. *Br J Dermatol* 1998;139 Suppl 53:17-29.

Lever R, Hadley K, Downey D, Mackie R. Staphylococcal colonization in atopic dermatitis and the effect of topical mupirocin therapy. *Br J Dermatol* 1988;119:189-198.

Lewis HM, Baker BS, Bokth S, Powles AV, Garioch JJ, Valdimarsson H, Fry L. Restricted T-cell receptor V beta gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 1993;129:514-520.

Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974;90:525-530.

Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 1990;63:475-484.

Lin L, DeMartino GN, Greene WC. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 1998;92:819-828.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-815.

Lowe JB, Ward PA. Therapeutic inhibition of carbohydrate-protein interactions in vivo. *J Clin Invest* 1997;100:S47-S51.

Ludwig R, Podda M, Beschmann HA, von Andrian UH, Kaufmann R, Zollner TM. Cyclosporine A and FK506 inhibit the expression and function of the cutaneous lymphocyte-associated antigen CLA on T-cells via (1,3)-fucosyltransferase VII. Eingereicht.

Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 1987;166:1654-1667.

Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1990;171:801-817.

Mackay CR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today* 1993a;14:99-102.

Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993b;5:423-427.

Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y,

Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 1996;86:643-653.

Manfras BJ, Rudert WA, Trucco M, Boehm BO. Analysis of the alpha/beta T-cell receptor repertoire by competitive and quantitative family-specific PCR with exogenous standards and high resolution fluorescence based CDR3 size imaging. *J Immunol Methods* 1997;210:235-249.

Manfras BJ, Terjung D, Boehm BO. Non-productive human TCR beta chain genes represent V-D-J diversity before selection upon function: insight into biased usage of TCRBD and TCRBJ genes and diversity of CDR3 region length. *Hum Immunol* 1999;60:1090-1100.

Marchal G, Seman M, Milon G, Truffa-Bachi P, Zilberfarb V. Local adoptive transfer of skin delayed-type hypersensitivity initiated by a single T lymphocyte. *J Immunol* 1982;129:954-958.

Marples RR, Heaton CL, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in psoriasis. *Arch Dermatol* 1973;107:568-570.

Marquardt T, Brune T, Luhn K, Zimmer KP, Korner C, Fabritz L, van der Werft N, Vormoor J, Freeze HH, Louwen F, Biermann B, Harms E, von Figura K, Vestweber D, Koch HG. Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 1999;134:681-688.

Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705-711.

McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270:11025-110258.

McFadden JP, Noble WC, Camp RD. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br J Dermatol* 1993;128:631-632.

Melski JW, Bernhard JD, Stern RS. The Koebner (isomorphic) response in psoriasis. Associations with early age at onset and multiple previous therapies. *Arch Dermatol* 1983;119:655-659.

Menssen A, Trommler P, Vollmer S, Schendel D, Albert E, Gurtler L, Riethmuller G, Prinz JC. Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol* 1995;155:4078-4083.

Michie CA, Davis T. Atopic dermatitis and staphylococcal superantigens. *Lancet* 1996;347:324.

Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997;91:385-395 .

Montgomery KF, Osborn L, Hession C, Tizard R, Goff D, Vassallo C, Tarr PI, Bomsztyk K, Lobb R, Harlan JM. Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6523-6527.

Moss P, Charmley P, Mulvihill E, Ziegler S, Raugi GJ, Kern D, Piepkorn M, Gelinas R. The repertoire of T cell antigen receptor beta-chain variable regions associated with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 1997;109:14-19.

Müller-Alouf H, Proft T, Zollner TM, Gerlach D, Champagne E, Desreumaux P, Geoffroy-Fauvet C, Fitting C, Cavaillon JM, Alouf JE. Comparative Immunological and Cytokine Inducing Properties of a Novel Superantigen (SMEZ) and Pyrogenic Exotoxin A of *Streptococcus pyogenes*. Eingereicht.

Mulligan MS, Watson SR, Fennie C, Ward PA. Protective effects of selectin chimeras in neutrophil-mediated lung injury. *J Immunol* 1993;151:6410-6417.

Mulligan MS, Warner RL, Rittershaus CW, Thomas LJ, Ryan US, Foreman KE, Crouch LD, Till GO, Ward PA. Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing sialyl Lewisx moieties. *J Immunol* 1999;162:4952-4959.

Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am J Pathol* 1992;141:1397-1408.

Neuber K, Steinrucke K, Ring J. Staphylococcal enterotoxin B affects in vitro IgE synthesis, interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-5 production in atopic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:179-182.

Nickoloff BJ, Mitra RS, Green J, Zheng XG, Shimizu Y, Thompson C, Turka LA. Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J Immunol* 1993;150:2148-2159.

Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today*. 1994;15:464-469.

Nickoloff BJ, Turka LA, Mitra RS, Nestle FO. Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995a;105(Suppl):25S-29S.

Nickoloff BJ, Kunkel SL, Burdick M, Strieter RM. Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic skin chimeras. Validation of a new animal model. *Am J Pathol* 1995b;146:580-588.

Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Animal models of psoriasis. *Nat Med* 1997;3:475-476.

Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol* 1999;155:145-158.

Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J, Wijdenes J, Morel P, Revillard JP. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet* 1991;338:321.

Noorduyn LA, Beljaards RC, Pals ST, van Heerde P, Radaszkiewicz T, Willemze R, Meijer CJ. Differential expression of the HECA-452 antigen (cutaneous lymphocyte associated antigen, CLA) in cutaneous and non-cutaneous T-cell lymphomas. *Histopathology* 1992;21:59-64.

Norholm-Pedersen A. Infections and psoriasis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1952;32:159-167.

Norrilind R. Significance of infections in the origin of psoriasis. *Acta Rheumatol Scand* 1955;1:135-144.

Paavonen T, Renkonen R. Selective expression of sialyl-Lewis x and Lewis a epitopes, putative ligands for L-selectin, on peripheral lymph-node high endothelial venules. *Am J Pathol* 1992;141:1259-1264.

Patel KD, Nollert MU, McEver RP. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J Cell Biol* 1995;131:1893-1902.

Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D. Dissection of human Langerhans cells' allostimulatory function: the need for an activation step for full development of accessory function. *Eur J Immunol* 1993;23:376-382.

Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 1994;24:884-891.

Pelleitier M, Montplaisir S. The nude mouse: a model of deficient T-cell function. *Methods Achiev Exp Pathol* 1975;7:149-166.

Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 1990;250:1130-1132.

Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990a;136:1053-1068.

Picker LJ, Terstappen LW, Rott LS, Streeter PR, Stein H, Butcher EC. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol* 1990b;145:3247-3255.

Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 1991a;349:796-799.

Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991;66:921-933.

Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992;10:561-591.

Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993a;150:1105-1121.

Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol* 1993b;150:1122-1136.

Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, Newman LS, Collins PA, Bergstresser PR, Leung DY. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur J Immunol* 1994;24:1269-1277.

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:21096-210103.

Podda M, Ludwig R, Esko JR, Kaufmann R, Zollner TM. Glycoside-based primers inhibit expression and function of the cutaneous lymphocyte-associated antigen by T-cells via inhibition of oligosaccharide side chain elongation. Eingereicht.

Price AA, Cumberbatch M, Kimber I, Ager A. Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med* 1997;186:1725-1735.

Prinz J, Braun-Falco O, Meurer M, Daddona P, Reiter C, Rieber P, Riethmuller G. Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet* 1991;338:320-321.

Prinz JC, Gross B, Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M, Plewig G. T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro via secreted products. *Eur J Immunol* 1994;24:593-598.

Prinz JC, Vollmer S, Boehncke WH, Menssen A, Laisney I, Trommler P. Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol* 1999;29:3360-3368.

Reekers R, Busche M, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Birch pollen-related foods trigger atopic dermatitis in patients with specific cutaneous T-cell responses to birch pollen antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:466-472.

Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997;90:373-383.

Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999a;341:1817-1828.

Robert C, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Ayehunie S, Hynes RO, Cheng G, Grabbe S, von Andrian UH, Kupper TS. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* 1999b;189:627-636.

Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: Doubt no more. *Immunology Today* 1991;12:256-257

Ross R, Ross XL, Ghadially H, Lahr T, Schwing J, Knop J, Reske-Kunz AB. Mouse Langerhans cells differentially express an activated T cell-attracting CC chemokine. *J Invest Dermatol* 1999;113:991-998.

Rossiter H, van Reijssen F, Mudde GC, Kalthoff F, Bruijnzeel-Koomen CA, Picker LJ, Kupper TS. Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur J Immunol* 1994;24:205-210.

Rotteveel FT, van Doornmalen AM, van Duin M. sLex is not responsible for the interaction of sLex-positive memory T lymphocytes with E-selectin. *Immunology* 1995;86:34-40.

Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol* 1999;135:574-580.

Rycraft RJG, Menne T, Frosch PJ. 1995. Textbook of contact dermatitis. Springer, Berlin.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.

Saloga J, Leung DY, Reardon C, Giorno RC, Born W, Gelfand EW. Cutaneous exposure to the superantigen staphylococcal enterotoxin B elicits a T-cell-dependent inflammatory response. *J Invest Dermatol* 1996;106:982-988.

Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT, Drzimalla K, Flohr P, Blaser K, Hauser C. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995;181:1935-1940.

Sarkar AK, Fritz TA, Taylor WH, Esko JD. Disaccharide uptake and priming in animal cells: inhibition of sialyl Lewis X by acetylated Gal beta 1->4GlcNAc beta-O-naphthalenemethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3323-3327.

Sarkar AK, Rostand KS, Jain RK, Matta KL, Esko JD. Fucosylation of disaccharide precursors of sialyl LewisX inhibit selectin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 1997;272:25608-25616.

Sasaki K, Kurata K, Funayama K, Nagata M, Watanabe E, Ohta S, Hanai N, Nishi T. Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis X carbohydrate determinants in leukocytes. *J Biol Chem* 1994;269:14730-14737.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283-286.

Schmidt A, Schmidt I. Entnahme und Transport von Proben für kulturelle mikrobiologische Untersuchungen. *Münch Med Wschr* 1996;138:432-435.

Schmidt KN, Podda M, Packer L, Baeuerle PA. Anti-psoriatic drug anthralin activates transcription factor NF-kappa B in murine keratinocytes. *J Immunol* 1996;156:4514-4519.

Schön MP, Detmar M, Parker CM. Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4+ T cells. *Nat Med* 1997;3:183-188.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985;161:526-546.

Schuler G. Kontaktallergie. *Wien Klin Wochenschr* 1993;105:641-647.

Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, Erle DJ, Horgan KJ, Luce GE, Lazarovits AI, Buck D, Shaw S. Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-tropism. *J Immunol* 1993;151:717-729.

Seabrook T, Au B, Dickstein J, Zhang X, Ristevski B, Hay JB. The traffic of resting lymphocytes through delayed hypersensitivity and chronic inflammatory lesions: a dynamic equilibrium. *Semin Immunol* 1999;11:115-123.

Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992;13:106-112.

Simon JC, Cruz PD Jr, Bergstresser PR, Davis LS, Tigelaar RE. Phorbol myristate acetate-activated keratinocytes stimulate proliferation of resting peripheral blood mononuclear lymphocytes via a MHC-independent, but protein kinase C- and

intercellular adhesion molecule-1-dependent, mechanism. *J Immunol* 1991;146:476-484.

Simon MM, Aragane Y, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *J Invest Dermatol* 1994;102:422-427.

Snapp KR, Wagers AJ, Craig R, Stoolman LM, Kansas GS. P-selectin glycoprotein ligand-1 is essential for adhesion to P-selectin but not E-selectin in stably transfected hematopoietic cell lines. *Blood* 1997;89:896-901.

Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 1998;63:732-739.

Sprenghard U, Kunz H, Hüls C, Schmidt W, Seiffge W, Kretzschmar G. Synthesis and biological activity of novel sialyl-Lewis X conjugates. *Bioorg Med Chem Letters* 1996;6:509-514.

Sprent J. Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. I. Fate in lymphoid tissues and intestines traced with 3H-thymidine, 125I-deoxyuridine and 51chromium. *Cell Immunol* 1976;21:278-302.

Sprent J. Lifespans of naïve, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993;5:433-438.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.

Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-872.

Stamper HB Jr, Woodruff JJ. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 1976;144:828-833.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-1162.

Sterry W, Bruhn S, Kunne N, Lichtenberg B, Weber-Matthiesen K, Brasch J, Mielke V. Dominance of memory over naive T cells in contact dermatitis is due to differential tissue immigration. *Br J Dermatol* 1990;123:59-64.

Sterry W, Kunne N, Weber-Matthiesen K, Brasch J, Mielke V. Cell trafficking in positive and negative patch-test reactions: demonstration of a stereotypic migration pathway. *J Invest Dermatol.* 1991;96:459-462.

Sterry W. Therapy with topical corticosteroids. *Arch Dermatol Res* 1992;284 Suppl 1:S27-29.

Sterry W, Staib G. Modern molecular biology diagnosis of malignant cutaneous lymphomas. *Hautarzt* 1995;46:4-9.

Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 1977;268:245-246.

Stingl G, Katz SI, Shevach EM, Wolff-Schreiner E, Green I. Detection of Ia antigens on Langerhans cells in guinea pig skin. *J Immunol* 1978;120:570-578.

Stossel H, Koch F, Kampgen E, Stoger P, Lenz A, Heufler C, Romani N, Schuler G. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1990;172:1471-1482.

Strange P, Skov L, Baadsgaard O. Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol* 1994;102:150-154.

Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL, Baadsgaard O. Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch Dermatol* 1996;132:27-33.

Streilein JW. Lymphocyte Traffic, T-cell malignancies and the skin. *J Invest Dermatol* 1978;71:167-171.

Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): Origins and functions. *J Invest Dermatol* 1983;80:12s-16s.

Streilein JW. Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J Invest Dermatol* 1989;93:443-448.

Strickland I, Hauk PJ, Trumble AE, Picker LJ, Leung DY. Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999;112:249-253.

Subramaniam M, Saffaripour S, Watson SR, Mayadas TN, Hynes RO, Wagner DD. Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J Exp Med* 1995;181:2277-2282.

Sundberg JP, Dunstan RW, Roop DR, Beamer WG. Full-thickness skin grafts from flaky skin mice to nude mice: maintenance of the psoriasiform phenotype. *J Invest Dermatol* 1994;102:781-788.

Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi M, Satoh T, Katayama I, Umeda T, Nishioka K. IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 1999;113:541-546.

Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 1993;361:79-82.

Tang T, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Mayadas TN. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* 1996;97:2485-2490.

Tiemeyer M, Swiedler SJ, Ishihara M, Moreland M, Schweingruber H, Hirtzer P, Brandley BK. Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1138-1142.

Tietz W, Allemand Y, Borges E, von Laer D, Hallmann R, Vestweber D, Hamann A. CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin. *J Immunol* 1998;161:963-970.

Trozak DJ. Topical corticosteroid therapy in psoriasis vulgaris: update and new strategies. *Cutis* 1999;64:315-318.

Tu L, Delahunty MD, Ding H, Luscinskas FW, Tedder TF. The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1999;189:241-252.

Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 1993;101:701-705.

Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 1995;16:145-149.

Vekony MA, Holder JE, Lee AJ, Horrocks C, Eperon IC, Camp RD. Selective amplification of T-cell receptor variable region species is demonstrable but not essential in early lesions of psoriasis vulgaris: analysis by anchored polymerase

chain reaction and hypervariable region size spectratyping. *J Invest Dermatol* 1997;109:5-13.

von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995;82:989-999.

von Andrian UH. Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation* 1996;3:287-300.

Wagers AJ, Lowe JB, Kansas GS. An important role for the alpha 1,3 fucosyltransferase, FucT-VII, in leukocyte adhesion to E-selectin. *Blood* 1996;88:2125-2132.

Wagers AJ, Stoolman LM, Kannagi R, Craig R, Kansas GS. Expression of leukocyte fucosyltransferases regulates binding to E-selectin: relationship to previously implicated carbohydrate epitopes. *J Immunol* 1997;159:1917-1929.

Wagers AJ, Waters CM, Stoolman LM, Kansas GS. Interleukin 12 and interleukin 4 control T cell adhesion to endothelial selectins through opposite effects on alpha1, 3-fucosyltransferase VII gene expression. *J Exp Med* 1998;188:2225-2231.

Wahl C, Miethke T, Heeg K, Wagner H. Clonal deletion as direct consequence of an in vivo T cell response to bacterial superantigen. *Eur J Immunol*. 1993;23:1197-1200.

Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 1990;250:1132-1135.

Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Kondo S, Shivji GM, Kim CS, Mak TW, Sauder DN. Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol* 1997;159:6148-6155.

Wang B, Zhuang L, Fujisawa H, Shinder GA, Feliciani C, Shivji GM, Suzuki H, Amerio P, Toto P, Sauder DN. Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 1999;162:277-283.

Weber-Matthiesen K, Sterry W. Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol* 1990;95:83-89.

Weinlich G, Heine M, Stossel H, Zanella M, Stoitzner P, Ortner U, Smolle J, Koch F, Sepp NT, Schuler G, Romani N. Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1998;110:441-448.

Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH. Specialized contributions by $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase (FucT)-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* in press, 2000.

Whyte JH, Baughman RD. Acute guttate psoriasis and streptococcal infection. *Arch Dermatol* 1964;89:350-356.

Wilson JB, Weinberg W, Johnson R, Yuspa S, Levine AJ. Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 1990;61:1315-1327.

Winn RK, Liggitt D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM. Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J Clin Invest* 1993;2:2042-2047.

Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G, Steinman RM. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1987;166:1484-1498.

Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 1996;98:1878-1887.

Xia L, Pan J, Yao L, McEver RP. A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood* 1998;91:1625-1632.

Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183:1001-1012.

Zollner TM, Polackova J, Keller T, Boehncke W-H, Kaufmann R, Sterry W. Regulation of cutaneous lymphocyte antigen expression by the superantigen exfoliative toxin. *Arch Dermatol Res* 1995;287:35 (A).

Zollner TM, Munk ME, Keller T, Nuber V, Boehncke WH, Kaufmann SH, Duijvestijn AM, Sterry W, Kaufmann R. The superantigen exfoliative toxin induces cutaneous lymphocyte-associated antigen expression in peripheral human T lymphocytes. *Immunol Lett* 1996;49:111-116.

Zollner TM, Wichelhaus T, Diehl S, Brade V, Kaufmann R. Superantigen-producing germs isolated from psoriasis patients induce the expression of the cutaneous lymphocyte-associated antigen by T cells in vivo. *J Invest Dermatol* 1997a; 108:635(A).

Zollner TM, Wichelhaus T, Duijvestijn AM, Boehncke W-H, Brade V, Kaufmann R. Production of superantigens by *S. aureus* is of clinical relevance in patients suffering from psoriasis and atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1997b;109:445(A).

Zollner TM, Nuber V, Duijvestijn AM, Boehncke WH, Kaufmann R. Superantigens but not mitogens are capable of inducing upregulation of E-selectin ligands on human T lymphocytes. *Exp Dermatol* 1997c;6:161-166.

Zollner TM, Neubert C, Wettstein A, Boehncke WH, Manfras B, Bohm BO, Sterry W. The T-cell receptor Vbeta repertoire of nickel-specific T cells. *Arch Dermatol Res* 1998;290:397-401.

Zollner TM, Kaufmann R. Superantigens in T cell mediated skin diseases--more than a coincidence! J Invest Dermatol. 1999;112:118-119.

Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, vonMallinckrodt C, Wagner TOF, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing Staphylococcus aureus is associated with increased severity of atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2000, 30:994-1000.

Zollner TM. Cyclosporin A in der Therapie der Psoriasis vulgaris. In: Boehncke WH und Kaufmann R. Moderne Antipsoriatika – Wirkmechanismen und klinische Anwendung. Uni-Med Verlag, Bremen, im Druck.

Zollner TM, Podda M, Beschmann HA, Duijvestijn AM, Ludwig R, Kaufmann R, von Andrian UH. Expression and function of skin-homing receptor cutaneous lymphocyte-associated antigen and α 1,3-fucosyltransferase VII mRNA are suppressed by NF- κ B inhibitors. Eingereicht.

6. Abkürzungsverzeichnis

ARF3	ADP Ribosylierungsfaktor 3
C	Komplement
CCR	Chemokinrezeptor
CHO	Chinese hamster ovary
CLA	Kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen
CD	Differenzierungskluster
DZ	Dendritische Zelle
ET	Exfoliatives Toxin
Fc	Konstantes Fragment
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FucT	Fucosyltransferase
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	IFN-induziertes Protein-10
KG	Körpergewicht
LFA	Leukozytenfunktionsantigen
MAdCAM	Mukosales Adressin-Zelluläres Adhäsionsmolekül
MDC	Makrophagen-deriviertes Chemokin)
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
MHC	Major histocompatibility complex für Haupthistokompatibilitätskomplex
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Plättchen-derivierter Wachstumsfaktor
PE	Phycoerythrin
PHA	Phythämagglutinin
PNAd	Peripheral Node Adressin für Adressin der peripheren Lymphknoten
POMC	Proopiomelanokortin
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RAST	Radioallergosorbent Test
SAg	Superantigen
SALT	Skin-associated lymphoid tissue für Haut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
SCID	severe combined immunodeficiency
SCORAD	Scoring of atopic dermatitis
SD	standard deviation für Standardabweichung
SIS	skin immune system für Hautimmunsystem
SEA	Staphylokokkenenterotoxin A
sLeX	sialysiertes Lewis X-Antigen
TARC	(Chemokin)
TCR	T-Zell Rezeptor
TCR V	Variables Segment des TCR
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Tc	Zytotoxische T-Zelle (CD8+)
Th	T Helfer Zelle (CD4+)
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin-1
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
VLA	Very late Antigen für spät exprimiertes Antigen (Adhäsionsmolekül)

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Roland Kaufmann danke ich aufrichtig für die kontinuierliche und uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit und meiner Person. Seine wissenschaftliche Begeisterungsfähigkeit und sein Ideenreichtum haben in mir die Freude an der Dermatologie geweckt.

Mein Dank gilt weiterhin meinen früheren akademischen Lehrern, Herrn Professor Dr. med. Eckehard Heidbreder (Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Würzburg) und Herrn Professor Dr. rer. nat. F. Alfred Anderer (Friedrich-Miescher-Labor, Max Planck-Institut Tübingen), deren wissenschaftlicher Enthusiasmus nicht unwesentlich meinen beruflichen Lebensweg beeinflusst hat.

Frau Sandra Diehl, Gitla Asmus, Katja Hardt-Weinelt und Heike Beschmann danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und ihre stete und ansteckende Freude an der Arbeit.

Meinen (ehemaligen) MitarbeiterInnen und DoktorandInnen Dr. rer. nat. Annette Wettstein, Dr. med. Verena Nuber, Dr. med. Tina Keller, Dr. med. Christian Neubert, Indre Freitag, Karin Spengler und Gregor Höpfner danke ich für ihr weit überdurchschnittliches Engagement. Ihr unermüdlicher Einsatz trugen nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Als Arzt ist klinische oder Grundlagen-orientierte Forschung ohne die kollegiale Hilfe seitens der KollegInnen schwer möglich, wofür auch ihnen mein Dank gilt. Der wissenschaftliche Gedankenaustausch und die Kritik der eigenen Arbeit ist in freundschaftlicher Atmosphäre besonders anregend, wofür ich Herrn Professor Dr. med. Henning Boehncke und Dr. med. Maurizio Podda besonders danke.

Diese Arbeit wäre allerdings ohne das immer liebevolle Verständnis meiner Frau für meine Arbeit nicht zu Stande gekommen. Schließlich hoffe ich, daß auch Julius, Valentin und Rosina ihrem Vater die weitgehende Abwesenheit in ihren ersten Lebensjahren nicht übel nehmen.