

# **Untersuchungen zur Chemotaxis von Lymphozyten bei Psoriasis**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Wolf Andreas Koch

Kiel  
2005

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN</b>	<b>IV</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Optimierung eines Verfahrens zum Nachweis von Lymphozytenchemokinen in biologischem Probenmaterial</b>	<b>5</b>
2.1.1 Isolierung und Kultur von Lymphozyten für die Chemotaxisuntersuchungen	6
2.1.1.1 HuT78	7
2.1.1.2 Periphere Blutlymphozyten	8
2.1.1.2.1 Isolierung von T-Lymphozyten im MACS-System	8
2.1.1.2.2 Gegenstrom-Zentrifugationselutration	9
2.1.1.2.3 Durchflußzytometrie: Quantitative Analyse der verschiedenen Zellpopulationen	10
2.1.1.2.4 Kultur der peripheren Blutlymphozyten	10
2.1.1.3 Th1-Lymphozyten	11
2.1.1.3.1 Nachweis einer Th1-Anreicherung	11
2.1.1.3.2 Verfahren zur Bestimmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion	11
2.1.2 Vorbehandlung der Chemotaxisfilter	12
2.1.3 Untersuchte Chemokine	12
2.1.4 Durchführung der chemotaktisch stimulierten Migration	12
2.1.5 Fixierung und Färbung der gewanderten Zellen	13
<b>2.2 Herstellung von Extrakten und Überständen sowie deren chromatographische Auftrennung</b>	<b>13</b>
2.2.1 Herstellung der Psoriasis-Hautschuppenextrakte	13
2.2.2 Herstellung eines Psoriasis-Hautschuppen- oder Kallusextraktes mit vorheriger Lipidextraktion	14
2.2.3 Kultur der Zellen für die Herstellung der Überstände	15
2.2.3.1 Zellkultur primärer Keratinozyten	15
2.2.3.2 Zellkultur der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT	15
2.2.3.3 Zellkultur primärer Fibroblasten	15
2.2.3.4 Zellkultur dendritischer Zellen	16
2.2.3.5 Zellkultur der Bronchialepithel-Zelllinie A549	16

---

2.2.4	Aufarbeitung der Extrakte und Überstände mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen	16
2.2.5	Chromatographische Auftrennung der Extrakte und Überstände	17
2.2.5.1	Heparin-Sepharose-HPLC	18
2.2.5.2	Präparative C8-Umkehrphasen-HPLC	18
2.2.5.3	Mikropore Kationenaustausch-HPLC	19
2.2.5.4	C4-Umkehrphasen-HPLC	19
2.2.5.5	Gelfiltrations-HPLC	20
2.2.5.6	Mikropore C2/C18-Umkehrphasen-HPLC	20
<b>2.3</b>	<b>Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakten auf Antikörper gegen bekannte Lymphozyten-Chemokine</b>	<b>21</b>
2.3.1	Enzymgebundener Immunoassay (ELISA)	21
2.3.2	Charakterisierung von Polypeptiden in der SDS-PAGE	22
2.3.2.1	PHAST-System	22
2.3.2.2	BioRad-System für SDS-PAGE	23
2.3.3	„Western Blot“	23
2.3.4	„Dot Blots“ von Psoriasis-Schuppenextrakten	24
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Optimierung der verschiedenen Parameter zur Messung chemotaktisch stimulierter Migration von Lymphozyten</b>	<b>25</b>
3.1.1	Isolierung, Kultur und Stimulation der Zellen	26
3.1.1.1	Die T-Zelllinie HuT78	26
3.1.1.2	Periphere Blutlymphozyten	26
3.1.1.3	Th1-Lymphozyten	27
3.1.2	Chemotaxisfilter und ihre Auswertung	29
3.1.3	Chemotaktische Aktivität für bereits bekannte Chemokine	30
3.1.4	Die chemotaktisch stimulierte Migration	31
3.1.5	Fixierung und Färbung der Zellen an der Filtermembran	31
3.1.6	Die optimierten Parameter	32
<b>3.2</b>	<b>HPLC-Auftrennung von Extrakten und Überständen und ihre chemotaktische Aktivität</b>	<b>32</b>
3.2.1	Psoriasis-Hautschuppenextrakte	37
3.2.2	Kallus-Hornextrakt	38
3.2.3	Überstände von primären, humanen Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT	38
3.2.4	Überstände primärer, humaner Fibroblasten	38
3.2.5	Überstände dendritischer Zellen	38
3.2.6	Überstände der Bronchialepithel-Zelllinie A549	38
<b>3.3</b>	<b>Immunoreaktivität für Lymphozyten-chemotaktische Chemokine in HPLC-Fractionen von Psoriasis-Schuppenextrakten</b>	<b>44</b>
3.3.1	Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakt für anti-CCL19-Antikörper im Festphasen-ELISA	44

---

3.3.2	Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakt für Antikörper gegen verschiedene Chemokine in der „Dot Blot“-Analyse	50
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung der Methodik</b>	<b>54</b>
4.1.1	Messung der chemotaktischen Aktivität von Leukozyten	54
4.1.2	Biologisches Verfahren zur Messung Lymphozyten-chemotaktischer Aktivität	55
4.1.2.1	Chemotaktisch stimulierte Migration in der Multikammer	55
4.1.2.2	Verschiedene Testzellen im Chemotaxisassay	56
4.1.2.2.1	Die Zelllinie HuT78	56
4.1.2.2.2	Periphere Blutlymphozyten	57
4.1.2.2.3	Th1-Lymphozyten	58
4.1.3	Chemotaktische Aktivität für bereits bekannte Chemotaxine	59
4.1.4	Die Wahl des biologischen Materials	61
<b>4.2</b>	<b>Chemotaktische Aktivität in HPLC-Fractionen der Extrakte und Überstände</b>	<b>63</b>
4.2.1	Strategie der Aufreinigung in der HPLC	63
4.2.2	Der Übergang von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe	63
4.2.3	Das entzündliche Infiltrat bei Psoriasis	65
4.2.4	Chemotaktische Aktivität in Psoriasis-Hautschuppenextrakten	66
4.2.5	Chemotaktische Aktivität in Kallusextrakten	70
4.2.6	Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen von Keratinozyten	70
4.2.7	Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen primärer Fibroblasten	71
4.2.8	Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen dendritischer Zellen	72
4.2.9	Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen der Bronchialepithel-Zelllinie A549	73
<b>4.3</b>	<b>Immunoreaktivität in Psoriasis-Schuppenextrakten</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS, SORTIERT NACH INDEXNUMMERN</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS, NACH AUTORENNAMEN SORTIERT</b>	<b>93</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>102</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>103</b>

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

<i>Tabelle 1:</i> Getestete Kulturbedingungen der in den Chemotaxismessungen verwandten Zellen	7
<i>Tabelle 2:</i> Antikörper für die Durchflußzytometer-Analysen	10
<i>Tabelle 3:</i> Übersicht aller untersuchten Überstände und Extrakte	17
<i>Tabelle 4:</i> HPLC-Anlagen, -Säulen und -Puffer bzw. -Laufmittel	18
<i>Tabelle 5:</i> Antikörper für ELISA, „Western Blots“ und „Dot Blots“	22
<i>Tabelle 6:</i> Übersicht chemotaktischer Aktivität der drei untersuchten Zellpopulationen für alle getesteten Chemokine	31
<i>Tabelle 7:</i> Zusammenfassung der optimierten Parameter für die Chemotaxis der drei Testzellpopulationen in der 48-Loch-Kammer	32
<i>Tabelle 8:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Psoriasis-Schuppenextrakten	39
<i>Tabelle 9:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Kallusextrakt	39
<i>Tabelle 10:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Überständen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und von primären, humanen Keratinozyten	40
<i>Tabelle 11:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Überständen primärer, humaner Fibroblasten	41
<i>Tabelle 12:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Überständen dendritischer Zellen	42
<i>Tabelle 13:</i> Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Überständen der Bronchialepithel-Zelllinie A549	44
<i>Tabelle 14:</i> Übersicht über alle „Dot Blot“-Ergebnisse mit der „Pure Nitrocellulose“-Membran von BioRad:	53
<i>Tabelle 15:</i> Übersicht über alle „Dot Blot“-Ergebnisse mit der ImmobilonP-Membran von Millipore:	53
<i>Abbildung 1:</i> Schematische Darstellung zum Vergleich der Haut eines gesunden Menschen mit der eines Patienten mit Psoriasis	3
<i>Abbildung 2:</i> 48-Loch-Mikrochemotaxis-Kammer von Costar / Whatman	5
<i>Abbildung 3:</i> Vergleich chemotaktisch stimulierter Migration von PBL zwischen IL-2- und OKT3-kultivierten Zellen	27
<i>Abbildung 4:</i> Analysen Th1-angereicherter PBMC im Durchflußzytometer	28
<i>Abbildung 5:</i> Chemotaktische Aktivität von Th1-Lymphozyten für fMLP	28
<i>Abbildung 6:</i> Chemotaktische Aktivität der drei untersuchten Zellpopulationen für einige Chemokine	30
<i>Abbildung 7 A - D:</i> Aufeinander folgende HPLC-Trennungen von Überständen dendritischer Zellen und HuT78-Chemotaxismessungen dieser HPLC-Fraktionen	34
<i>Abbildung 8:</i> C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der daraus hervorgegangenen Fraktionen.	46
<i>Abbildung 9:</i> Kationenaustausch-HPLC der Fraktionen 8 und 9 aus Lauf 05 und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der entstandenen Fraktionen.	47
<i>Abbildung 10:</i> C2/C18-Umkehrphasen-HPLC von Fraktion 19 aus der vorausgegangenen Kationenaustausch-HPLC und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der entstandenen Fraktionen sowie Kaninchen-Normalserum-Festphasen-ELISA der Fraktionen 14 bis 21 aus diesem Lauf.	49
<i>Abbildung 11:</i> SDS-PAGE der Fraktionen 14 bis 21 der o. a. C2/C18-HPLC im Vergleich mit rekombinant-humanem CCL19.	49
<i>Abbildung 12:</i> Chemilumineszenz des „Western Blots“ einer PHAST-SDS-PAGE der Fraktionen 15 bis 20 der o. a. C2/C18-HPLC mit Antikörpern gegen CCL19.	50
<i>Abbildung 13:</i> „Dot Blot“-Analyse aller Fraktionen einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt mit polyklonalen Antikörpern gegen CCL17 und einer BioRad-„Pure Nitrocellulose“-Membran.	51
<i>Abbildung 14:</i> „Dot Blot“-Analyse von Fraktionen einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt mit polyklonalen Antikörpern gegen CXCL12 $\alpha$ und einer ImmobilonP-Membran.	52

## Verzeichnis der Abkürzungen

Zusätzlich zu allgemein gebräuchlichen Abkürzungen nach den Empfehlungen von Nomenklaturkomitees wurden folgende Abkürzungen verwendet:

APS	<b>A</b> mmonium- <b>P</b> ersulfat
BSA	Rinderserum-Albumin
C5a	„complement fragment <b>5a</b> “
CB	Chemotaxis-Puffer
CCR	<b>CC</b> -Chemokinrezeptor
CD	„cluster of <b>d</b> ifferentiation“
CDSN	„corneodesmosin“
CLA	„cutaneous lymphocyte-associated <b>a</b> ntigen“
CTACK	„cutaneous <b>T</b> cell-attracting chemokine“ (CCL27)
CXCR	<b>CXC</b> -Chemokinrezeptor
DC	dendritische Zellen
DMEM	„ <b>D</b> ULBECCO's modified <b>E</b> AGLE's <b>m</b> edium“
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
ECACC	„European collection of cell cultures“
EDTA	<b>E</b> thylendiamintetraacetat
ELC	„ <b>E</b> PSTEIN-BARR virus-induced molecule 1 ligand chemokine“ (CCL19)
ELISA	„enzyme linked immunosorbent <b>a</b> ssay“
FCS	fetales Kälber-Serum
FITC	„fluorescein isothiocyanat“
fMLP	n-formyl- <b>M</b> ethionyl- <b>L</b> eucyl- <b>P</b> henylalanin
Glu	<b>G</b> lutamin
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony-stimulating <b>f</b> actor“
GRO- $\alpha$	„growth-related oncogene- $\alpha$ “ (CXCL1)
HaCaT	humane, adulte Keratinozyten, niedrige <b>Ca</b> <sup>2+</sup> -Konzentration, erhöhte Temperatur
HEPES	n-2-Hydroxyethyl-Piperizin-n'-2-Ethansulphonsäure
HETE	<b>H</b> ydroxyeicosatetraenolsäure
HLA	humanes <b>L</b> eukozyten- <b>A</b> ntigen
HODD	<b>H</b> ydroxyoctadecadienolsäure
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HuT78	<b>H</b> umanes, kutanes <b>T</b> -Zell-Lymphom <b>78</b>
ICAM	„intercellular <b>a</b> dhesion <b>m</b> olecule“
I-TAC	Interferon-induzierbares <b>T</b> -Zell-alpha-Chemoattraktant (CXCL11)
IL	Interleukin
IU	„international <b>u</b> nits“
KGM	„keratinocyte <b>g</b> rowth <b>m</b> edium“
LARC	Leber- und <b>A</b> ktivierungs-reguliertes <b>C</b> hemokin (CCL20)

---

LFA-1	<b>Leukozyten-funktionsassoziiertes Antigen 1</b>
LTB <sub>4</sub>	<b>Leukotrien B<sub>4</sub></b>
MACS	„ <b>m</b> agnetic cell sorter“
MCP-1	<b>M</b> onozyten- <b>c</b> hemotaktisches <b>P</b> rotein <b>1</b> (CCL2)
HuMig	„ <b>h</b> uman <b>m</b> onokine induced by interferon- <b>g</b> amma“ (CXCL9)
MIP-4	„ <b>m</b> acrophage <b>i</b> nflammatory <b>p</b> rotein“ <b>4</b> (CCL18)
MoDC	aus Monozyten differenzierte dendritische Zellen
NC	Nitrozellulose
OPD	<b>ortho-Phenylen-Diamin</b>
PAF	<b>plättchenaktivierender Faktor</b>
PBL	<b>p</b> eriphere <b>B</b> lutlymphozyten
PBMC	periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	<b>Phycoerythrin</b>
PGE <sub>2</sub>	<b>Prostaglandin E<sub>2</sub></b>
PGF <sub>2α</sub>	<b>Prostaglandin F<sub>2α</sub></b>
PHA	<b>Phytohämagglutinin</b>
PSORS	<b>P</b> soriasis- <b>S</b> uszeptibilitätsgen
PVP	<b>Polyvinylpyrrolidon</b>
RANTES	„ <b>r</b> egulated upon <b>a</b> ctivation, <b>n</b> ormal <b>T</b> cell <b>e</b> xpressed and <b>s</b> ecreted“ (CCL5)
RP	<b>r</b> everse <b>P</b> hase
SCID	„ <b>s</b> evere <b>c</b> ombined <b>i</b> mmunodeficiency“
SDF-1	„ <b>s</b> tromal- <b>d</b> erived <b>f</b> actor <b>1</b> “ (CXCL12)
SDS-PAGE	„ <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfat- <b>p</b> olyacrylamid- <b>g</b> e <b>e</b> lectrophorese“
SHL	„ <b>s</b> kin <b>h</b> oming lymphocytes“
SLC	<b>s</b> ekundäres <b>L</b> ymphgewebe- <b>C</b> hemokin (CCL21)
TARC	„ <b>t</b> hymus and <b>a</b> ctivation- <b>r</b> egulated <b>c</b> hemokine“ (CCL17)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit „Tween20“
Tc	Zytotoxische T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TECK	<b>T</b> hymus- <b>e</b> xprimiertes <b>C</b> hemokin (CCL25)
TEMED	<b>N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin</b>
TFA	<b>Trifluor-Acetat</b>
Th	<b>T-Helferzellen</b>
TNF-α	<b>Tumornekrosefaktor α</b>
Tris	<b>Tris</b> (hydroxymethyl)-aminomethan
U	„ <b>u</b> nits“

# 1 Einleitung

Jedes Wirbeltier grenzt sich mit seiner Haut von der Außenwelt ab. Seine Haut bildet die erste Barriere gegen physikalische, chemische oder pathogene Einflüsse aus seiner Umwelt. Darüber hinaus stellt es über die Haut Kontakt mit seiner Umgebung her, sie ist Träger vieler Sinnesrezeptoren. Wird diese Barriere von fremden Substanzen oder Organismen durchbrochen, so tritt im gesunden Wirbeltier das Immunsystem in Aktion, um das eindringende Agens zu prüfen und gegebenenfalls zu bekämpfen. Haut und Immunsystem bilden so einen engen Verbund zum Schutz gegen das „Nicht-Selbst“.

Beim Immunsystem unterscheidet man zwischen der – wahrscheinlich stammesgeschichtlich älteren – angeborenen und der jüngeren erworbenen Immunität. Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind beispielsweise die von ELIE METCHNIKOFF gefundenen und als Makrophagen bezeichneten phagozytischen Zellen, die zahlreiche verschiedene Pathogene sofort angreifen, ohne diesen vorher schon einmal begegnet sein zu müssen. EDWARD JENNER entdeckte 1796 den Schutz von Menschen gegen Pocken durch Impfung mit Kuhpocken- oder Vaccinia-Viren. Auch wenn der dabei zugrunde liegende Mechanismus erst sehr viel später aufgeklärt werden konnte, nutzte JENNER bereits eine wichtige Eigenschaft des erworbenen (adaptiven) Teils des menschlichen Immunsystems. Die Impfung veranlaßte den Organismus, Antikörper auszubilden, welche spezifisch für die eingebrachten Viren waren und einen dauerhaften Schutz gegen die den Kuhpocken ähnlichen humanen Pockenviren vermittelten.

Gebildet werden Antikörper von Lymphozyten, einer Gruppe weißer Blutzellen (Leukozyten). Die Lymphozyten entstehen im Knochenmark, in dem ein Teil von ihnen auch reift. Diese Gruppe von Immunzellen nennt man B-Lymphozyten („bone marrow“). Die übrigen Lymphozyten wandern zur Reifung in den Thymus und werden daher als T-Lymphozyten bezeichnet. Im Anschluß an ihre Reifung zirkulieren beide Zellgruppen zwischen Blut und peripheren lymphatischen Geweben. B-Lymphozyten differenzieren nach Kontakt mit einem Antigen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. T-Lymphozyten entwickeln sich zu T-Effektorzellen mit einer Reihe unterschiedlicher Funktionen<sup>1</sup>. Ebenfalls im Knochenmark befinden sich gemeinsame, sogenannte myeloide Vorläuferzellen für alle weiteren zellulären Bestandteile des Immunsystems. Aus ihnen gehen Granulozyten, Mastzellen und Monozyten hervor, aus letzteren entwickeln sich Makrophagen und dendritische Zellen<sup>1</sup>.

Entsprechend ihrer gemeinsamen Aufgabe – einem Schutz des Organismus vor dem „Nicht-Selbst“ – stehen die Zellen des Immunsystems und der Haut in enger Interaktion miteinander. Diese Interaktion findet einerseits über direkte Zellkontakte sowie andererseits über biochemische Substanzen, die Zytokine und lipidartigen Mediatoren, statt. Ist in dieser Interaktion das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorisch wirkenden Komponenten gestört, kann es zu einer Reihe von Erkrankungen kommen. Die Aufklärung der dabei wirkenden Mechanismen bildet nicht nur eine Voraussetzung für eine Entwicklung wirksamer Therapien, sondern vermittelt auch ein verbessertes Verständnis über die Funktionsweise des gesunden Systems.

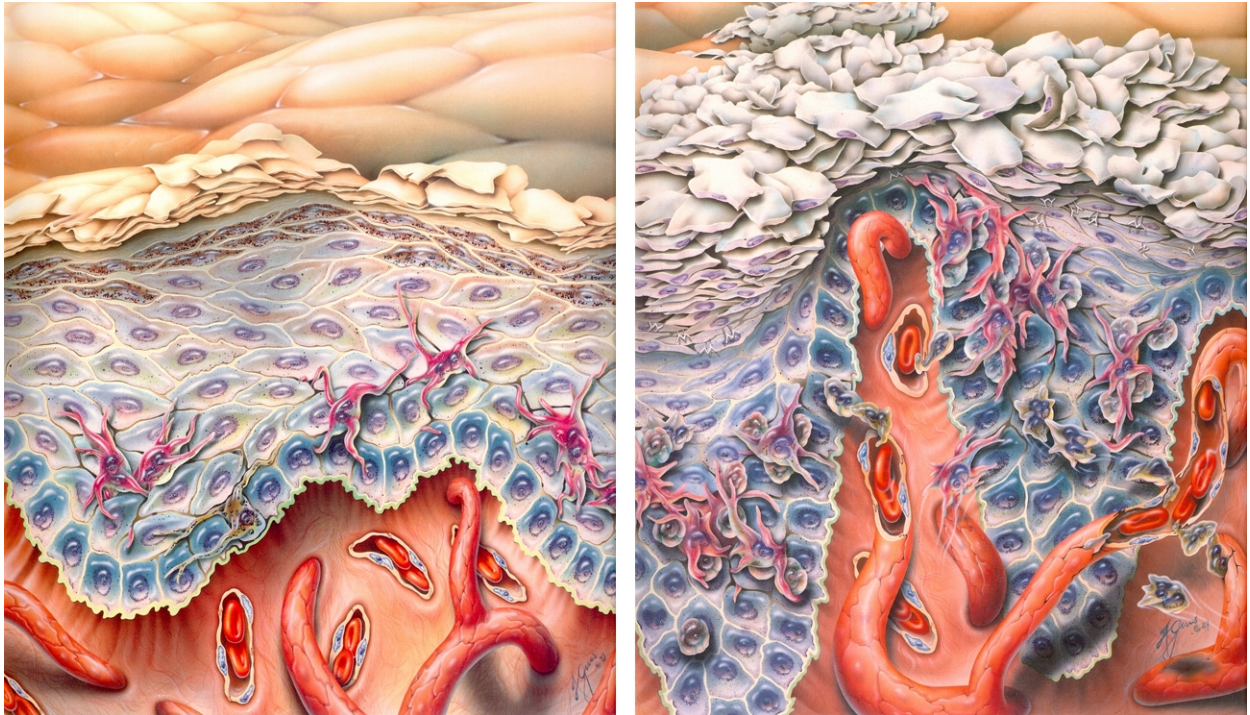


Eine solche Erkrankung mit gestörtem regulatorischen Gleichgewicht und einer Beteiligung von Komponenten des Immunsystems ist die Psoriasis.

*Psoriasis vulgaris* kommt ausschließlich beim Menschen vor und tritt weltweit mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 3% der gesamten Bevölkerung auf. Psoriasis ist in allen Ethnien vertreten, am stärksten jedoch unter der weißen Bevölkerung Nordeuropas und Skandinaviens. Für ca. 20% aller Betroffenen bedeutet die Erkrankung eine signifikante Verschlechterung ihrer Lebensqualität<sup>2</sup>. Kennzeichnend für Psoriasis sind charakteristische, schuppige Herde der äußeren Haut, daher stammt die Bezeichnung „Schuppenflechte“. Diese Herde sind Folge einer bis zu 10-fach erhöhten Teilungsrate der Keratinozyten in der Epidermis, verbunden mit ihrer unvollständigen Differenzierung zu Hornzellen<sup>3</sup>. Im betroffenen Gewebe zeigt sich eine Erweiterung des dermalen Gefäßgeflechts durch Gefäßneubildung<sup>4</sup> sowie ein verstärktes Auftreten von Entzündungszellen in Dermis und Epidermis<sup>5</sup> (vgl. *Abbildung 1* aus GERAS<sup>6</sup>).

Die Ursachen der Erkrankung sind noch immer teilweise ungeklärt, als sicher gilt aber eine genetische Beteiligung. Die stärkste bekannte genetische Assoziation mit *Psoriasis vulgaris* liegt in der Region PSORS1 auf Chromosom 6p21.3. Patienten mit dem HLA-Typ HLA-Cw\*6 haben ein 10fach erhöhtes Erkrankungsrisiko<sup>7</sup>. Eine weitere Assoziation besteht mit dem Allel CDSN\*5<sup>8</sup>. CDSN kodiert für das Protein Korneodesmosin, von dem angenommen wird, daß es eine Schlüsselrolle bei der Kohäsion von Korneozyten spielt<sup>9</sup>.

Eine Reihe unterschiedlicher Zellen des Immunsystems kann in der Haut psoriatischer Plaques nachgewiesen werden. Bestandteil dieses entzündlichen Infiltrats sind neutrophile Granulozyten<sup>10</sup> in der Epidermis sowie als erste Immunzellen in neu entstehenden Plaques überhaupt Monozyten<sup>11</sup>, die in der Dermis gefunden wurden<sup>12</sup>. Makrophagen fanden sich in der Dermis um die Blutgefäße herum<sup>10</sup>, eine Untergruppe auch entlang der Basallamina<sup>13,14</sup>. Aus Monozyten des peripheren Blutes hervorgegangene dendritische Zellen<sup>15</sup> konnten in der oberen Dermis sowie in der Epidermis in unmittelbarer Nähe von T-Lymphozyten gefunden werden<sup>16</sup>. T-Lymphozyten wurden hauptsächlich im Bereich der Basallamina und der Blutgefäße<sup>10</sup> nachgewiesen und bilden den dominierenden Anteil von Immunzellen im Infiltrat<sup>10</sup>. Der Übergang von Leukozyten aus dem Blutstrom in entzündetes Gewebe erfolgt über Zelloberflächenmoleküle auf den Endothelzellen der Blutgefäße (P- und E-Selectine) und auf den Immunzellen (Integrine und Immunoglobulin-ähnliche Adhäsionsmoleküle)<sup>17</sup>. Bei der Orientierung der Immunzellen im Gewebe spielen gelöste Polypeptide, z. B. Chemokine, und lipidartige Mediatoren eine entscheidende Rolle. Deren Gradienten leiten Leukozyten an ihren Wirkungsort. Chemokine sind aber auch auslösende Faktoren für den Übergang der Immunzellen aus dem Blut in die Gewebe<sup>18,19</sup>.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung zum Vergleich der Haut eines gesunden Menschen (**A**) mit der eines Patienten mit Psoriasis (**B**)

**A:** Dargestellt sind (von unten nach oben) die Dermis (Unterhaut) mit den Blutgefäßen, die Basallamina (gelb-grün) sowie die Epidermis, bestehend aus den basalen Keratinozyten, der Stachelzellschicht mit LANGERHANS-Zellen, dem *Stratum granulosum* sowie der Hornschicht. **B:** Die Haut in einer psoriatischen Läsion zeigt charakteristische Veränderungen: Die peripheren Blutgefäße der oberen Dermis sind gegenüber denen gesunder Haut verdickt und verlängert. Die Retezapfen sind lang ausgezogen und die Epidermis zeigt abschnittsweise eine fehlerhafte Verhornung (Parakeratose) mit Verlust des *Stratum granulosum*. Die basalen Keratinozyten sind hypertroph, bilden mehrere Zellagen und zeigen eine ca. 10fach erhöhte Proliferationsrate. Infolgedessen bildet sich an der Oberfläche der Epidermis eine Schicht von Schuppen aus lockerer, nicht kohärenter Hornmasse, z. T. mit Zellkernresten. Dargestellt ist außerdem die Ansammlung von Leukozyten in der gesamten Epidermis bis hinein in die Hornschicht.

Zahlreiche Hinweise deuten bei *Psoriasis vulgaris* auf eine primär immunologische Erkrankung mit T-Lymphozyten als Mediatoren hin<sup>20,21</sup>. So gehören T-Zellen zu den ersten Leukozyten, die in sich neu bildende Plaques infiltrieren<sup>22</sup>. Der Mechanismus, der zu einer Migration von T-Zellen in die erkrankte Haut und damit zu einem Fortschreiten der Erkrankung führt, ist bisher nicht genügend geklärt. Insbesondere die für das Infiltrieren der T-Zellen und ihre Migration zum psoriatischen Plaque verantwortlichen Chemotaxine sind bisher nicht bekannt.

Eine Reihe von chemotaktisch wirksamen Substanzen für T-Lymphozyten wurde bereits beschrieben (z. B. CCL20 (LARC)<sup>23</sup> und CXCL11 (I-TAC)<sup>24</sup>). Dennoch ist bisher nicht klar, welche chemotaktisch wirksame Substanz für das T-Zell-Infiltrat in psoriatischen Plaques entscheidend ist.

Aufgrund dieser bestehenden Unklarheit wurde folgende Fragestellung formuliert:

Befindet sich in Psoriasis-Hautschuppen eine ausreichende Menge einer chemotaktisch wirksamen, proteinartigen Substanz, um das Einwandern von T-Lymphozyten in psoriatische Plaques erklären zu können?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Extrakte aus Hautschuppen von Psoriasispatienten hergestellt und in verschiedenen Schritten mit Hilfe der Hochdurchsatz-Flüssigchromatographie (HPLC) aufgetrennt. Die daraus resultierenden Fraktionen wurden in einem biologischen Assaysystem auf ihre chemotaktische Wirksamkeit für Lymphozyten getestet. Als Testzellen dienten die Zelllinie HuT78 sowie Lymphozyten des peripheren Blutes. Darüber hinaus wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes angereicherte Th1-Lymphozyten in den Chemotaxisexperimenten eingesetzt. Das Testsystem unter Verwendung einer BOYDEN-Multikammer wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert, weil die der Literatur entnommenen Parameter für diese Art von Tests (z. B. PLEASS & CAMP<sup>25</sup>) mit Lymphozyten nicht zu der erforderlichen Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führten.

Neben den Psoriasis-Hautschuppen wurde weiteres biologisches Material auf seinen Gehalt an Lymphozyten-chemotaktischen Proteinen hin untersucht. Als Gegenprobe zu den Hautschuppen aus erkranktem Gewebe diente Fersenkallus nicht an Psoriasis erkrankter Personen. Überstände aus Zellkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten wurden getestet, da diese Zellen den wesentlichen Bestandteil der – gesunden wie erkrankten – Haut ausmachen. Zellkulturüberstände von aus Monozyten differenzierten dendritischen Zellen wurden untersucht, weil diese Zellen einen wichtigen Bestandteil des entzündlichen Infiltrats psoriatischer Plaques darstellen. Als Beispiel für ein hornzellfreies Epithel dienten Überstände aus Zellkulturen der Bronchialepithel-Zelllinie A549.

Die Chemotaxismessungen wurden ergänzt durch die Tests zur Immunoreaktivität für eine Reihe bereits bekannter Lymphozytenchemokine in HPLC-Fractionen der Psoriasis-Hautschuppenextrakte.

Die durchgeführten Experimente ließen sich in drei Abschnitte gliedern, eine Testoptimierung, die chemotaktischen Messungen sowie die Untersuchungen zur Immunoreaktivität. Diese dreiteilige Struktur wurde auch in der Numerierung der Kapitel aufgenommen. Aus diesem Grund wird in Methoden- und Ergebnisteil sowie in der Diskussion jeweils mit der Testoptimierung begonnen (*Kapitel 2.1, 3.1 und 4.1*). Dann folgen die Chemotaxisexperimente (*Kapitel 2.2, 3.2 und 4.2*) und im jeweils dritten Segment die immunochemischen Messungen (*Kapitel 2.3., 3.3 und 4.3*).

Um den Lesefluß in Abschnitten mit vielen Literaturziten nicht zu unterbrechen, wurden Indexnummern für die Zitate verwendet. Aus diesem Grund sind zwei Literaturverzeichnisse enthalten, eines nach Indexnummern sortiert (*Abschnitt 7*), das zweite in der alphabetischen Reihenfolge der Autorennamen (*Abschnitt 8*).

Diese Arbeit ist nach alter Rechtschreibung abgefaßt. Der Autor sieht sich dabei an den Volksentscheid Schleswig-Holsteins vom 27. September 1998 gebunden.

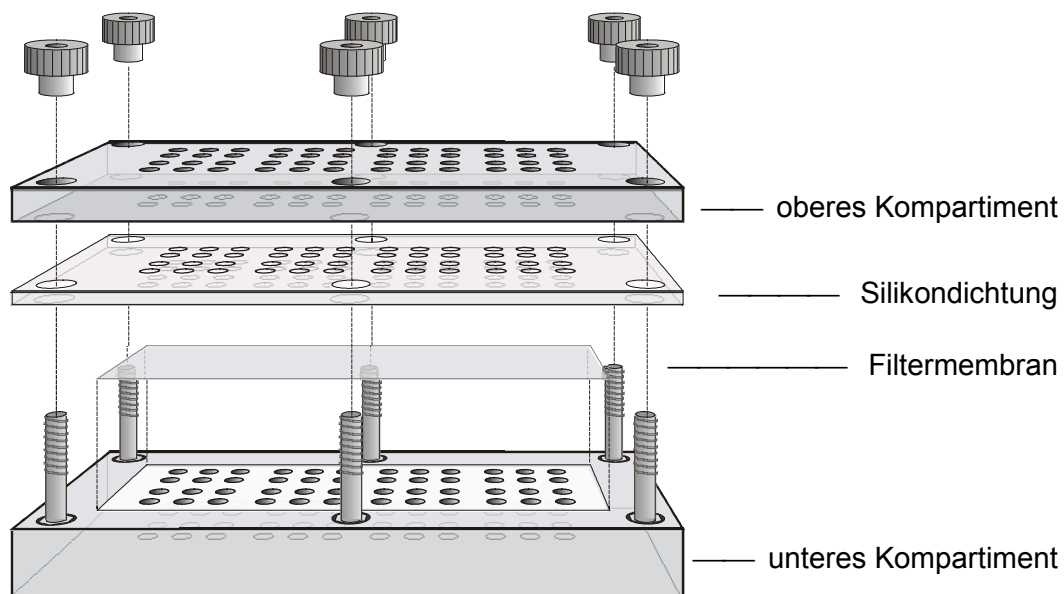
## 2 Material und Methoden

*Kapitel 2.1* beinhaltet eine Darstellung der Untersuchungsmethode zur Messung der Lymphozytenchemotaxis und bildet die Bandbreite aller getesteten Parameter für deren Optimierung ab. Die Herstellung des untersuchten biologischen Materials sowie dessen Auftrennung in der HPLC werden in *Kapitel 2.2* gezeigt. Eine immunochemische Untersuchungsmethode für den Nachweis bereits bekannter Chemokine in Material aus Psoriasis-Hautschuppen wird in *Kapitel 2.3* dargestellt.

### 2.1 Optimierung eines Verfahrens zum Nachweis von Lymphozytenchemokinen in biologischem Probenmaterial

Das biologische Verfahren zur Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von Lymphozyten in Abhängigkeit von biologischem Probenmaterial wurde nach einer Modifikation der von MROWIETZ & JÜRGENS<sup>26</sup> beschriebenen Methode durchgeführt. Die chemotaktische Wanderung von Lymphozyten fand in einer Mikrochemotaxiskammer statt, in der zeitgleich 48 Einzelproben auf ihre Chemotaxis stimulierenden Eigenschaften getestet werden konnten. Für Monozyten war die Methode bereits gut etabliert<sup>26</sup>. Damit dieses Testsystem auch mit Lymphozyten eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse liefern konnte, mußten im ersten Teil dieses Projektes eine Vielzahl von Parametern verändert und optimiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendete 48-Loch-Mikrochemotaxiskammer (Costar / Whatman, USA, *Abbildung 2*) bestand aus zwei Acrylglas-Kompartimenten. Im unteren befanden sich die Proben, in das obere wurden die Testzellen gegeben. Beide Teile waren durch eine Filtermembran voneinander getrennt. Eine Silikonmatte dichtete das System zu den Seiten hin ab.



**Abbildung 2:** 48-Loch-Mikrochemotaxis-Kammer von Costar / Whatman

Als Testzellen in der Chemotaxis wurden die T-Zelllinie HuT78, periphere Blutlymphozyten (PBL) und aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes angereicherte Th1-Zellen verwendet.

Das zu testende biologische Probenmaterial wurde aus Zellkulturüberständen sowie Extrakten von Hautschuppen und Fersenkallus gewonnen und in verschiedenen Schritten mittels der Hochdurchsatz-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt.

Diejenigen Proben, die aus einer Umkehrphasen-HPLC-Auftrennung mit Hilfe einer Nucleosil-C8-Säule stammten, wurden in 20 µl großen Fraktionen gefriergetrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte die Zugabe von je 60 µl RPMI1640 mit 10% FCS (v/v). Stammen die Proben aus nachfolgenden HPLC-Trennungen (MonoS und andere), wurden je 1-2 µl daraus mit je 58-59 µl RPMI-FCS aufgefüllt. In die Vertiefungen des Kammerbodens wurden je 25-28 µl der zu testenden Fraktionen eingefüllt, so daß immer zwei Vertiefungen identisch befüllt waren.

Auf den befüllten Kammerboden wurde ein Filter aus Polycarbonat (PVP-frei, 5 bzw. 8 µm Porendurchmesser, Nuclepore, Bodenheim) aufgelegt und darauf eine über den Vertiefungen der Kammer gelochte Silikondichtung. Der Kammerdeckel wurde aufgesetzt und in seine Löcher je 50 µl der Zellsuspension eingefüllt.

Der Filter trennte die Zellen im oberen Teil der Chemotaxiskammer von den zu testenden Fraktionen im unteren Teil. Im Falle chemotaktisch stimulierter Migration wanderten die Zellen vom oberen Kompartiment durch die Poren des Filters in den unteren Teil der Kammer und hefteten sich an der Unterseite des Filters an. Diese Adhärenz wurde durch Beschichtung der Filterunterseite mit humanem Kollagen Typ IV (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) oder humanem EDTA-Plasma (8 mM EDTA) aus Blutspenden ermöglicht.

Nach Ablauf einer Inkubation zwischen 20 min und 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h Dauer bei 37 °C folgte die Entnahme des Filters aus der Kammer. Die auf der Filteroberseite verbliebenen Zellen wurden durch 3maliges Spülen in PBS und Abstreifen an einer Gummilippe entfernt. Eine Behandlung des Filters zur Fixierung und Färbung der Zellen an der Filterunterseite folgte. Zur semiquantitativen Bestimmung der chemotaktischen Aktivität wurde die Färbung jedes Feldes mit Positiv- und Negativkontrolle verglichen.

### **2.1.1 Isolierung und Kultur von Lymphozyten für die Chemotaxisuntersuchungen**

Das Kulturmedium für alle getesteten Lymphozyten-Populationen (HuT78, PBL, Th1) sowie für Monozyten, dendritische Zellen und primäre Fibroblasten bestand, sofern nicht anders beschrieben, aus

- RPMI1640 (+ 25 mM HEPES, BioConcept, Umkirch) mit
- 10% (v/v) FCS (BioConcept),
- 100 IU/ml Penizillin-Streptomycin (Gibco BRL / Life Technologies, Karlsruhe) und
- 2 mM L-Glutamin (BioWhittaker, Taufkirchen).

Kulturmedium dieser Zusammensetzung wird im folgenden RPMI-FCS genannt.

Die Bedingungen zur Stimulation und Anreicherung der verschiedenen Testzellpopulationen während der Kultur sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

HuT78	periphere Blutlymphozyten	Lymphozyten in der Th1-Anreicherung
unstimuliert	18h Kultur unstimuliert	2-3 Tage PHA, IL-12, anti-human IL-4, dann 3-6 Tage IL-2
2 Tage PHA	2 Tage unstimuliert	
2 Tage PHA, 5 Tage IL-2	2-3 Tage IL-2	
2 Tage PHA, 7 Tage IL-2	2 Tage PHA	
3 Tage PHA, 5 Tage IL-2	Kulturflasche 3-24 h OKT3-beschichtet, 3 Tage Kultur	

**Tabelle 1:** Getestete Kulturbedingungen der in den Chemotaxismessungen verwandten Zellen

Die Tabelle zeigt die Bedingungen, unter denen die Zellen für chemotaktische Untersuchungen kultiviert wurden. Die HuT78-Zellen stammten stets aus exponentiell wachsenden Kulturen, die PBL und die Lymphozyten in der Th1-Anreicherung aus der Interphase einer Ficoll-Zentrifugation von Vollblut oder „Buffy Coat“. Die PBL waren durch nachfolgende Elutriation aus PBMC isoliert worden.

Die eingesetzten Konzentrationen für PHA lagen bei 0,5 - 2,0 µg/ml und für IL-2 bei 100-400 U/ml. Rekombinant-humanes IL-12 wurde mit einer Konzentration von 2 ng/ml, Antikörper gegen humanes IL-4 mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml zu den Zellkulturen gegeben.

### 2.1.1.1 HuT78

Die Zelllinie HuT78 (humanes, kutanes T-Zell-Lymphom<sup>27</sup>) wurde von der ECACC über BioConcept erworben. Die Lagerung der Zellen erfolgte in DMSO-Medium (10% (v/v) DMSO, 40% (v/v) FCS, 50% (v/v) RPMI1640), gekühlt in flüssigem Stickstoff bei -195,8 °C. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut (<1 min) und sofort in das 30-fache Volumen RPMI1640 mit 20% (v/v) FCS gegeben. Es folgte eine Zentrifugation (Minifuge RF, Haereus, Hanau) bei 4 °C und 260 x g.

Das Sediment wurde in RPMI1640 mit 20% (v/v) FCS resuspendiert. Ein kleiner Anteil der Zellen wurde mit Trypanblau (0,4% w/v, Sigma, Taufkirchen) angefärbt und in der NEUBAUER-Kammer gezählt. Die Vitalität entsprach dem Quotienten der Anzahl nicht blau gefärbter Zellen zu der Anzahl aller Zellen. Die vitalen Zellen wurden gezählt und mit Dichten zwischen  $3 \times 10^5$  und  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-FCS aufgenommen. Ihre Inkubation erfolgte bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Nach Erreichen einer Dichte zwischen  $9 \times 10^5$  und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml wurden sie zentrifugiert (260 x g) und erneut in frischem Medium und neuen Kulturflaschen kultiviert oder mit einer Dichte von  $10^6$ - $10^7$  Zellen/ml ( $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch) für die Chemotaxismessungen eingesetzt.

### 2.1.1.2 Periphere Blutlymphozyten

Als Quellen der in den Untersuchungen dieser Arbeit verwendeten nativen Zellen dienten einerseits Vollblut von Patienten der Hautklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, andererseits sogenannte „Buffy Coats“ aus der Klinik für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Bei den Isolierungen aus Vollblut wurden je 240 ml peripheres Blut mit ca. 8 mM EDTA („Titriplex III“, Merck, Darmstadt) bei 600 x g über Ficoll („Separating Solution“, Biochrom, Berlin) zentrifugiert. Die Interphase mit den peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) wurde abgenommen, mit PBS + 0,1% (w/v) BSA (PAA Laboratories, Österreich) aufgefüllt und bei 260 x g zentrifugiert.

Die „Buffy Coats“ („Compoflex“, Eumer-Compascuum, Niederlande) enthielten polymorphonukleäre Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aus je 450 ml Blut in einem Volumen von 50 ml Plasma. Je ein „Buffy Coat“ wurde mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und im weiteren wie für Vollblut beschrieben behandelt.

Aus den PBMC wurden entweder mittels MACS isolierte T-Lymphozyten oder mit Hilfe der Gegenstrom-Zentrifugationselutriation gereinigte periphere Blutlymphozyten gewonnen. Die Zusammensetzung der resultierenden Zellpopulationen wurde stichprobenartig in der Durchflußzytometrie analysiert.

#### 2.1.1.2.1 Isolierung von T-Lymphozyten im MACS-System

Im MACS-System wurden Zellen über Antikörper mit paramagnetischen Partikeln, sogenannten „MicroBeads“, verbunden und dann in einer Säule, die in einem starken Magneten positioniert war, selektiv zurückgehalten. Zellen, die keine Antigene zu den entsprechenden Antikörpern auf ihrer Oberfläche trugen, wurden durch die Säule hindurchgespült.

Für die Isolierung mit Hilfe des MACS-Systems wurden Zellen aus 240 ml Vollblut oder die Hälfte der Zellen aus einem „Buffy Coat“ verwendet. Die aus der Interphase der Ficoll-Zentrifugation stammenden PBMC wurden zweimal in PBS gewaschen. Nach gründlichem Abgießen des Überstandes erfolgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten durch Resuspension der Zellen in Ammoniumchloridlösung (160 mM in destilliertem Wasser, pH 7). Nach 7 min wurde die Suspension bei 260 x g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Waren noch Erythrozyten übrig – erkennbar an der Rotfärbung des Sediments – wurde die Lyse wiederholt. Die verbliebenen PBMC wurden in RPMI-FCS resuspendiert, zentrifugiert und in MACS-Puffer (PBS + 2 mM EDTA + 5% (v/v) humanes A/B-Serum, Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Multikanal-Analysator (Coulter Counter ZM und Coulter Channelyzer 256).  $10^8$  Zellen wurden abgenommen und mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt.

Die Isolierung der T-Lymphozyten aus jeweils  $10^8$  PBMC im MACS erfolgte mit Hilfe des „Pan-T-Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und einer VS<sup>+</sup>-Separationssäule (Miltenyi Biotec) entsprechend der Anleitung. Mit Hilfe dieses „Kits“ wurden B-Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen, erythrozytäre Vorstufen, Thrombozyten und

basophile Granulozyten in der Säule zurückgehalten. Nach Inkubation der PBMC mit dem „Hapten-Antikörper-Cocktail“, einem Gemisch verschiedener Antikörper gegen CD11b (CD: „cluster of differentiation“, Oberflächenprotein), CD16, CD19, CD36 und CD56, wurden die Antikörper-gebundenen Zellen mit „Anti-Hapten MicroBeads“ (sekundärer Antikörper an „MicroBeads“ gekoppelt) an die Magnetpartikel gebunden und so in der Säule zurückgehalten. Durch diese negative Selektion kam eine Suspension mit allen T-Lymphozyten bis auf die wenigen CD56-positiven aus der Säule heraus.

Die so gewonnenen T-Zellen wurden zentrifugiert und im Multikanal-Analysator (Coulter) gezählt. Aus  $10^8$  PBMC konnten ca.  $5-6 \times 10^7$  T-Lymphozyten isoliert werden.

#### 2.1.1.2.2 Gegenstrom-Zentrifugationselutriation

Im MACS-System konnten je Säule nur maximal  $10^8$  Zellen gereinigt werden. Zur Verbesserung der Ausbeute wurden die PBL später statt dessen durch Gegenstrom-Zentrifugationselutriation gewonnen (Methode modifiziert nach ZHENG *et al.*<sup>28</sup>). Hierbei erfolgte eine Trennung der PBMC nach Größe und Dichte. Das Elutriationssystem bestand aus einer Zentrifuge (J2-21M/E, Beckmann, USA), in der sich ein Elutriationsrotor (JE-6B, Beckmann) befand. Im Rotor befand sich eine Kammer mit Zu- und Abfluß. Die Zentrifuge mit dem Elutriationsrotor wurde auf 4 °C gekühlt und bei 600 U/min Kammer und Schläuche des Systems durch Spülen mit PBS von Luftblasen befreit. Während der Elutriation wurde mit PBS + 0,1% (w/v) BSA gespült. Bei 3000 U/min liefen die zuvor in 50ml PBS + 0,1% (w/v) BSA resuspendierten Zellen über den Zufluß in die Kammer ein. Ein Gleichgewicht zwischen Zentrifugalkraft und Gegenstrom hielt die Zellen zunächst in der Kammer. Die Durchflußgeschwindigkeit von anfangs 10 ml/min wurde allmählich erhöht. Je kleiner die Zellen waren, desto eher wurden sie herausgespült. Zur Kontrolle, welche Zellen herauspülten, wurden stichprobenartig je 10 Tropfen am Abfluß aufgefangen und im Multikanal-Analysator gezählt. Ab ca. 17 ml/min waren die Erythrozyten fast vollständig herausgespült. Die bei weiterer Steigerung der Durchflußgeschwindigkeit herausgespülten Lymphozyten wurden gesammelt. Ab ca. 22 ml/min kamen die ersten Monozyten aus der Kammer. Diese wurden in einem zweiten Sammelgefäß für die Gewinnung dendritischer Zellen (siehe *Kapitel 2.2.3.4*) aufgefangen.

Da die aus der Elutriation gewonnenen Zellen für mindestens 2 Tage kultiviert werden sollten, mußte die Auftrennung unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wurden vor der Elutriation alle Schläuche und der Rotor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (6% v/v, Merck) gespült und mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf erfolgte die 1stündige Inkubation mit dem Antimykotikum Amphotericin B („Fungizone“ 5 µg/ml in PBS, BioConcept). Später wurden auch zur Zellkultur 2,5 µg/ml Amphotericin B gegeben.

Die Lymphozyten wurden bei 260 x g zentrifugiert. Die Lyse der verbliebenen Erythrozyten erfolgte wie bei der MACS-Isolierung beschrieben mit Hilfe von Ammoniumchloridlösung. Danach wurde die Suspension bei 260 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in RPMI-FCS resuspendiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert, in RPMI-FCS resuspendiert und ein Aliquot im Multikanal-Analysator gezählt.



### 2.1.1.2.3 Durchflußzytometrie: Quantitative Analyse der verschiedenen Zellpopulationen

Die Anteile an Monozyten, B-Lymphozyten, T-Helfer- und zytotoxischen T-Lymphozyten an den aus der Elutriation gewonnenen Zellen wurden in einigen Fällen per Durchflußzytometrie ermittelt. Dabei wurde die Expression von CD3 (T-Lymphozyten), CD4 (T-Helfer-Zellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) sowie CD14 (Monozyten) gemessen.

Je  $10^6$  Zellen wurden in 100 µl PBS in Durchflußzytometer-Röhrchen (5 ml, Sarstedt) resuspendiert. Der jeweilige Antikörper (gegen CD3, 4, 8 oder 14) wurde in der vom Hersteller empfohlenen Menge zugegeben. In einem zweiten Ansatz erfolgte die Zugabe des zum Antikörper passenden Isotyps (*Tabelle 2*). Die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Sie wurden mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Nach Resuspendieren in 300 µl PBS erfolgte die Messung im Durchflußzytometer (Coulter Epics XL). Der Nullwert (< 2% der Zellen positiv) wurde dabei mit Hilfe der Zellen, die mit dem Isotyp inkubiert worden waren, eingestellt. Die Steuerung des Gerätes und die Darstellung der Messungen erfolgte mit der Software Coulter System II, Version 3.0 auf einem Pentium-PC.

Oberflächen-Antigen	Markierung	zugehöriger Isotyp	Hersteller
CD3	FITC	IgG1	Coulter Clone
CD4	FITC	IgG1	Coulter Immunotech
CD8	FITC	IgG1	Coulter Immunotech
CD14	FITC	IgG2b	Coulter Clone
CD3	PE	IgG1	Coulter Immunotech

**Tabelle 2:** Antikörper für die Durchflußzytometer-Analysen

Dargestellt ist eine Übersicht über die in den Durchflußzytometer-Analysen der Lymphozytenkulturen verwendeten Antikörper.

### 2.1.1.2.4 Kultur der peripheren Blutlymphozyten

Die Lymphozyten wurden entweder für 2-3 Tage mit IL-2 (100-200 U/ml, „Proleukin“, rekombinant aus *Escherichia coli* K12, Chiron, USA) oder für 2 Tage mit PHA (0,5 - 2,0 µg/ml, Nurex Biotec, Großbritannien) bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

In einigen Fällen wurden die PBL mit anti-CD3-Antikörpern (OKT3) stimuliert. Dazu war zuvor eine 6-Loch-Platte (6 x 9,6 cm<sup>2</sup>, Polystyrol, Nunc, Dänemark) für 3-24 h mit 10 ml sterilem OKT3 (Orthoclone Muromonab CD3, Janssen-Cilag, Neuss; 10 µg/ml in Natriumkarbonat-Puffer pH 8) bei 37 °C beschichtet worden<sup>29</sup>. Die Kulturplatte wurde 3mal mit sterilem PBS ausgespült. 3,2 bis 6,3 x 10<sup>7</sup> Lymphozyten je Platte wurden in RPMI-FCS mit einer Dichte von 1,79 bis 2,84 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in die Vertiefungen (je 3,0 - 4,5 ml) der Platte gefüllt und für 2 Tage bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### 2.1.1.3 Th1-Lymphozyten

Neben den beschriebenen Verfahren zur Isolierung von PBL bzw. T-Lymphozyten wurden Th1-Lymphozyten in den chemotaktischen Tests verwandt. Ihre Gewinnung erfolgte mittels Adhärenz und anschließender Anreicherung.

Th1-angereicherte Lymphozyten wurden aus je 240 ml Vollblut oder „Buffy Coats“ gewonnen (modifiziert nach BONECCHI *et al.*<sup>30</sup>). Die gesamte Präparation verlief unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde das Blut wie oben beschrieben über Ficoll zentrifugiert. Die Interphase wurde in PBS gewaschen und die verbliebenen Erythrozyten mit Ammoniumchloridlösung lysiert. Es erfolgte eine Verminderung des Anteils an Monozyten durch Anheftung am Kulturflaschenboden. Dazu wurden die Zellen in einem Volumen von 200-400  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Bodenfläche in RPMI-FCS für 2 h bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Lymphozyten, die grundsätzlich nicht anhefteten, wurden durch leichtes Schwenken vom Boden aufgewirbelt und zusammen mit dem Medium in eine neue Kulturflasche überführt. Nach Zentrifugation erfolgte eine Inkubation der Zellen mit einer Ausgangsdichte von ca.  $6 \times 10^6$  Lymphozyten/ml für insgesamt 3 Tage in RPMI-FCS mit PHA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IL-12 (rekombinant-humanes P70, 2 ng/ml, PharMingen, USA) und Antikörpern gegen IL-4 (gereinigt, gegen humanes IL-4, 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PharMingen). Am zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach drei Tagen wurden die Zellen zentrifugiert (260 x g) und für weitere drei bis sechs Tage mit einer Ausgangsdichte zwischen  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  Lymphozyten/ml in RPMI-FCS mit 100 U/ml IL-2 inkubiert.

#### 2.1.1.3.1 Nachweis einer Th1-Anreicherung

Um zu kontrollieren, ob noch chemotaktisch aktive Monozyten in der Kultur waren, wurde bei den Chemotaxismessungen mit Th1-angereicherten Lymphozyten fMLP ( $10^{-8}$  M, Sigma) als zusätzliche Negativkontrolle eingesetzt. Der Gehalt an Monozyten, ungeachtet ihrer chemotaktischen Aktivität, wurde mit Hilfe von Durchflußzytometer-Untersuchungen zur Expression von CD14 überprüft.

Zur Kontrolle, ob und in welchem Maße die oben beschriebenen Kulturbedingungen tatsächlich zu einer Th1-Lymphozyten-Anreicherung geführt hatten, wurden Durchflußzytometer-Untersuchungen zur Expression von CD4 sowie zur IFN- $\gamma$ -Sekretion durchgeführt.

#### 2.1.1.3.2 Verfahren zur Bestimmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion

Th1-angereicherte Lymphozyten mit einer Dichte von  $10^7$  Zellen/ml in RPMI1640 + 10% (v/v) A/B-Serum (Serum eines Patienten der Blutgruppe A/B, Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel) wurden in zwei Aliquots aufgeteilt, von denen eines mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert wurde (siehe Kapitel 2.1.1.2.4) und das andere ohne Stimulation blieb. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 3 h inkubiert. OKT-3 stimulierte die Th1-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$ . Die ohne OKT-3 inkubierten Zellen wurden bei der Messung der IFN- $\gamma$ -Sekretion im Durchflußzytometer zur Einstellung der Empfindlichkeit des Gerätes verwendet, analog zur Funktion der Isotyp-markierten Zellen bei

den Durchflußzytometer-Messungen von CD3, CD4, CD8 und CD14 (vgl. *Kapitel 2.1.1.2.3* und BONECCHI *et al.*<sup>30</sup>).

Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (260 x g) und in der NEUBAUER-Kammer gezählt. Zur Bestimmung der IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde ein „IFN- $\gamma$  Catch Reagent“ (Miltenyi Biotech) an die Oberfläche der Zellen gebunden. Sezernierten die Zellen IFN- $\gamma$ , band dieses an das „Catch Reagent“ und konnte dann mit einem PE-markierten Antikörper („IFN- $\gamma$  Detection Antibody“, Miltenyi Biotech) im Durchflußzytometer semiquantitativ gemessen werden.

Die Markierung von je  $10^6$  Zellen mit „IFN- $\gamma$  Catch Reagent“ und anschließend dem „IFN- $\gamma$  Detection Antibody“ erfolgte entsprechend der Anleitung des „IFN- $\gamma$  Secretion Assay Detection Kit“.

### 2.1.2 Vorbehandlung der Chemotaxisfilter

Für die Chemotaxisexperimente wurden Polyvinylpyrrolidon- (PVP-) freie Polykarbonat-Filter der Größe 8,2 x 3,0 cm mit den Porengrößen 5 und 8  $\mu\text{m}$  von Nuclepore verwendet. Diese besaßen eine raue und eine glatte Seite, deren Orientierungen in der Chemotaxiskammer variiert wurden.

In einigen Fällen wurden unbeschichtete Filter verwendet. Vor den meisten Chemotaxismessungen erfolgte die 1- bis 3-stündige Beschichtung der Filter entweder mit Maus-Kollagen Typ IV (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS, GibcoBRL) oder mit humanem Blutplasma (aus EDTA-Vollblut) bzw. humanem Kollagen Typ IV (10  $\text{ng}/\text{ml}$  in destilliertem Wasser + 0,025% (v/v) Eisessig, Sigma). Diese Beschichtungen wurden auf der glatten und bzw. oder auf der rauhen Seite des Filters vorgenommen und zum oberen oder zum unteren Kompartiment der Chemotaxiskammer hin orientiert.

In einigen Fällen erfolgte eine Vorbehandlung unbeschichteter Filter der Porengröße 5  $\mu\text{m}$  mit 1 M NaOH in 50% (v/v) Ethanol für 30 min, um anionische Ladungen auf der Oberfläche anzureichern. Diese Filter wurden anschließend zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 10 min in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) getaucht.

### 2.1.3 Untersuchte Chemokine

Verschiedene bereits als Lymphozyten-Chemokine bekannte Substanzen wurden auf ihre chemotaktischen Eigenschaften für die verschiedenen Zellpopulationen getestet. Alle aufgeführten Chemokine waren rekombinant-human. C5a stammte von Sigma, CCL19, CCL5, CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$  und CXCL8 wurden von der Firma BioConcept erworben, CCL2 von Amimed (Schweiz) und CCL17 von PeproTech (Großbritannien).

### 2.1.4 Durchführung der chemotaktisch stimulierten Migration

Die Zählung und Vitalitätsbestimmung der in den Chemotaxismessungen eingesetzten Zellen erfolgte mit Hilfe einer NEUBAUER-Kammer unter dem Mikroskop nach Färbung eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau. Verschiedene Zelldichten wurden in der Chemotaxis

eingesetzt. Bei PBL variierten diese zwischen  $10^6$  und  $1,6 \times 10^7$  und bei HuT78 zwischen  $10^6$  und  $10^7$  vitaler Zellen/ml. Bei Th1-Lymphozyten betrug die Dichte stets  $8 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Chemotaxiskammern wurden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%iger  $\text{CO}_2$ - und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre für 1 bis 4 h inkubiert.

Chemokinese bezeichnet die erhöhte Motilität von Zellen aufgrund eines chemischen Reizes. Als Chemotaxis wird diese Bewegung dann bezeichnet, wenn sie eine bevorzugte Richtung auf den Reiz hin oder vom Reiz weg hat. Um sicher zu stellen, daß in den vorliegenden Experimenten Chemotaxis und keine Chemokinese gemessen wurde, erfolgte eine so genannte Schachbrett-Analyse<sup>31</sup>. Dabei wurde CCL19  $10^{-8}$  M sowohl in das untere als auch gemeinsam mit den Testzellen in das obere Kompartiment der Kammer eingesetzt. Die Menge der unter diesen Bedingungen gewanderten Zellen wurde wie unten beschrieben ermittelt und mit der „normalen“ Positivkontrolle – CCL19  $10^{-8}$  M nur im unteren Kompartiment – verglichen.

### 2.1.5 Fixierung und Färbung der gewanderten Zellen

Nach vorsichtigem Öffnen der Chemotaxiskammern wurden auf der Filteroberseite verbliebene Zellen durch 3maliges Auflegen der Filter auf PBS und Abstreifen an einer Gummilippe entfernt. Zur Fixierung der Zellen an den Filtern wurden diese entweder senkrecht hängend in Methanol (Merck) getaucht oder zur Vermeidung von Scherkräften mit ihrer Unterseite vorsichtig auf eine Methanoloberfläche aufgelegt und untergetaucht. Später erfolgte die Fixierung statt mit Methanol mit der Fixierlösung des Diff-Quik-Färbesets (Dade Behring, Schweiz). Die Fixierdauer variierte zwischen 10 sek und 2 min. In einigen Fällen wurde der Versuch unternommen, die Zellen durch 20-30-minütige Trocknung an der Raumluft zu fixieren.

Zur Färbung wurden die Filter erst für 1-10 Minuten in Hämatoxyllin (Accustain, Sigma) getaucht, dann kurz in destilliertem Wasser gespült und schließlich in HCl-Ethanol (1% (v/v) rauchende HCL in 96% Ethanol) für wenige Sekunden entfärbt, bis die Hintergrundfärbung gerade verschwand. Zur Gegenfärbung wurden die Filter für 1 min in eine Bläulösung (80 mM  $\text{MgSO}_4$  + 24 mM  $\text{NaHCO}_3$  in destilliertem Wasser) getaucht und schließlich in destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Diese Färbereihe wurde später durch Lösung I und II des Diff-Quik-Färbesets (je 3 min) und nachfolgendes zweimaliges Spülen in destilliertem Wasser ersetzt.

## 2.2 Herstellung von Extrakten und Überständen sowie deren chromatographische Auftrennung

### 2.2.1 Herstellung der Psoriasis-Hautschuppenextrakte

Das Schuppenmaterial wurde freundlicherweise von der Abteilung für Dermatologie der Fachklinik Bad Bentheim zur Verfügung gestellt. Für alle Präparationen bis auf eine (B) standen Hautschuppengemische verschiedener Psoriasis-Patienten zur Verfügung. Die Schuppen wurden von Fremdmaterial (Haaren etc.) gereinigt. Quellen des Schuppenmaterials erfolgte in der 5-fachen Menge (w/v) einer Lösung von 20 mM Zitrat, 60 mM Ammoniumformiat und 10%

Ethanol in destilliertem Wasser. Dieses Gemisch wurde mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Nach Auftauen der Schuppen am nächsten Tag erfolgte die mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines Scherkraftdesintegrators (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen) für 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> - 2 h bei 12000 U/min im Eisbad. Das so entstandene Gemisch wurde mit 4900 x g für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Minifuge RF). Nach Abnehmen des Überstandes und Resuspension des Sedimentes im doppelten Volumen 96%igen Ethanols erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 min bei 4900 x g und Raumtemperatur. Der zweite Überstand wurde zu dem der ersten Zentrifugation gegeben und beides nochmals bei 4900 x g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Die Fettschicht wurde von der Oberfläche abgesaugt und der Überstand 4-6mal in neue Gefäße überführt und wie zuvor für je 10 min zentrifugiert, so daß schließlich eine klare Lösung entstand.

Mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen erfolgte die Vorbereitung dieser Lösung für die HPLC (*Kapitel 2.2.4*).

### **2.2.2 Herstellung eines Psoriasis-Hautschuppen- oder Kallusextraktes mit vorheriger Lipidextraktion**

Zur Steigerung der Ausbeute bei der Extraktion von Proteinen aus Psoriasis-Hautschuppen oder Kallus wurden in zwei Fällen zuvor die Lipide entfernt. Das Kallusgewebe stammte von Patienten der Hautklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Das Schuppen- oder Kallusmaterial wurde zur dreifachen Menge (w/v) Zitratpuffer (100 mM Zitrat in 1 l destilliertem Wasser + 100 mM NaOH, pH 4) gegeben und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zerkleinerung des Gemischs erfolgte am nächsten Tag im Eisbad mit Hilfe eines Ultra-Turrax für 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>-2 h bei 12000 U/min. Nach Verdopplung des Volumens durch Zugabe von Ethylacetat wurde die Mischung in einem großen Gefäß kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur mit 850 x g für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R).

Es entstand eine Auftrennung in 4 Phasen: Zuunterst befand sich ein Schuppen- bzw. Kallusediment, darüber die wäßrige Phase mit dem Hauptanteil an Protein. Schuppen- bzw. Kallusfragmente bildeten die nächste Schicht und obenauf befand sich das Ethylacetat, das den größten Teil der Lipide enthielt. Das Ethylacetat wurde abgegossen, die restlichen Phasen verrührt und zusammengegeben.

Mit der gleichen Menge Ethylacetat wurde eine erneute Extraktion der verbliebenen Lipide durchgeführt, wie oben beschrieben. Die wäßrige Phase wurde gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Die beiden Schuppen- bzw. Kallusphasen wurden mit dem 4-fachen Volumen an 96%igem Ethanol gemischt und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte die Zentrifugation des Ethanol-Schuppen- bzw. -Kallusgemischs für jeweils 10 min bei 4900 x g 4-6mal, so daß ein klarer Überstand entstand. Er wurde mit der vom Vortag stammenden wäßrigen Phase zusammengegeben und im Rotationsverdampfer (Laborata 4000 Digital, Heidolph, Kelheim) vom restlichen Ethylacetat befreit. Die Vorbereitung des Extraktes für die HPLC-Auftrennung erfolgte mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen.

### **2.2.3 Kultur der Zellen für die Herstellung der Überstände**

Neben den oben beschriebenen Extrakten wurden Überstände verschiedener Zellkulturen auf ihren Gehalt an Lymphozyten-chemotaktischen Substanzen hin untersucht.

#### **2.2.3.1 Zellkultur primärer Keratinozyten**

Die Isolierung primärer Keratinozyten erfolgte aus Vorhäuten zirkumzensierter Knaben. Die Vorhäute stammten aus der Klinik „Waldwiese“ in Kiel. Die Vorhaut wurde mit der epidermalen Seite nach unten gelegt und mit Hilfe von Schere und Pinzette lockeres Bindegewebe und Fett von ihr entfernt. Nach Zerschneiden der Vorhaut in kleine Streifen erfolgte 2-maliges Waschen in PBS und die Behandlung mit Trypsin (0,125% (w/v) in PBS, 12-24 h bei 4 °C). In Keratinozyten-Kulturmedium (KGM, BioConcept) wurde die Epidermis mit Hilfe einer Pinzette abgezogen, in neues Medium überführt und durch häufiges Abspülen wurden die Keratinozyten abgelöst. Nach Zentrifugation der Zellen und erneuter Aufnahme in KGM erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Zur Stimulation der Keratinozyten wurden 10 µg/ml Latexextrakt oder 10 µg/ml Milbenextrakt (beides von Allergopharma, Reinbek) für 48 h zur Kultur gegeben. Die Vorbereitung der daraus gewonnenen Überstände für die HPLC erfolgte in einer Ultrafiltrationsrührzelle.

#### **2.2.3.2 Zellkultur der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT**

Die zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorenen HaCaT-Zellen<sup>32</sup> wurden in DMEM mit 10% FCS, 100 IU/ml Penicillin-Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Nach Anwachsen zu semikonfluenter Dichte wurden sie für 48 h mit 30 ng/ml Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) inkubiert. Nach Zentrifugation (Heraeus Minifuge RF, 260 x g) erfolgte die Vorbereitung der Kulturüberstände für die HPLC mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen.

#### **2.2.3.3 Zellkultur primärer Fibroblasten**

Zur Isolierung der primären Fibroblasten dienten Haut-Stanzen von Patienten der Hautklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Stanzen wurden mit ihrer epidermalen Seite nach unten in eine Petrischale gelegt und das Fettgewebe entfernt. Kleine Stückchen der Haut wurden mit ihrer dermalen Seite am Boden einer zuvor mit RPMI-FCS befüllten Zellkulturflasche angedrückt. Es folgte die Inkubation der aufrecht stehenden Flasche über Nacht bei 37 °C, bei der die Haut, ohne mit Kulturmedium in Berührung zu kommen, am Boden anheftete. Dann wurde die Flasche waagrecht für weitere 7-14 Tage bei 37 °C inkubiert, während die Hautstückchen von dem Medium bedeckt waren. Während dieses Zeitraumes wuchsen primäre Fibroblasten aus den Hautstückchen heraus. Diese wurden mit Trypsin (5 min, 0,05% (w/v) in PBS, Biochrom) vom Boden gelöst, zentrifugiert, in Medium resuspendiert und in einer neuen Kulturflasche inkubiert, bis sie konfluent (den Boden dicht bedeckend) gewachsen waren. Nach 7 solcher Passagen wurden die semikonfluenten (den Boden lückenhaft bedeckenden) Fibroblasten im Stadium exponentiellen Wachstums gründlich mit PBS gespült, in DMEM (mit 5,6 mM Glukose, BioConcept) mit 30 ng/ml TNF $\alpha$  (PeproTech)

aufgenommen und für weitere 48 h inkubiert. Das aus dieser letzten Inkubation stammende Medium wurde nach der Zentrifugation in Ultrafiltrationsrührzellen für die HPLC vorbereitet. In zwei Fällen wurde auf eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  verzichtet und Überstände aus der exponentiell wachsenden Kultur verwendet (Präparationen H und I, siehe **Tabelle 3**).

#### **2.2.3.4 Zellkultur dendritischer Zellen**

Die Gewinnung dendritischer Zellen erfolgte durch Differenzierung von Monozyten mit 100 U/ml GM-CSF (rekombinant-human, PeproTech) und 10 ng/ml IL-4 in RPMI-FCS für 5-7 Tage. Dazu wurden 240 ml Vollblut über Ficoll zentrifugiert und aus der resultierenden Interphase analog zur Lymphozyten-Isolierung im Elutriator (*Kapitel 2.1.1.2.2*) die Monozyten isoliert. Diese Monozyten wurden in RPMI1640 (mit Penicillin-Streptomycin und Glutamin) mit GM-CSF / IL-4 und entweder 10% (v/v) FCS oder 1,5% (v/v) autologem Plasma inkubiert. Die Gewinnung der Überstände erfolgte entweder nach 3-4 oder nach 5-7 Tagen durch Zentrifugation.

#### **2.2.3.5 Zellkultur der Bronchialepithel-Zelllinie A549**

Die Kultivierung der zuvor eingefrorenen A549-Zellen (humanes Lungenkarzinom<sup>33</sup>) erfolgte in DMEM für 72 h mit 30 ng/ml TNF $\alpha$  und 10 ng/ml IL-4 (BioConcept). Nach Zentrifugation wurden die Überstände der Zellkulturen in Ultrafiltrationsrührzellen für die HPLC vorbereitet.

### **2.2.4 Aufarbeitung der Extrakte und Überstände mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen**

Die Reduktion der Volumina von Extrakten aus Psoriasis-Hautschuppen, Kallusgewebe oder Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe von Ultrafiltrationsrührzellen (Modell 8200 und 8400, Amicon / Millipore, USA). Auch ein Laufmittelwechsel zwischen zwei HPLC-Schritten wurde auf diese Weise vorgenommen. Die Flüssigkeiten wurden dabei mit Hilfe von unter Druck (~5 bar) stehendem Stickstoff durch einen Filter (YM-3 Ultrafiltration Membranes, Diaflo) gepreßt, der für Moleküle größer 3 kDa undurchlässig war. In einem geringeren Restvolumen blieb ein Konzentrat dieser Substanzen zurück, welches – nach Zentrifugation zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile – in der HPLC aufgetrennt wurde.

Eine Übersicht aller untersuchten Proben ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Präparation	Bezeichnung	Kulturbedingungen
A	Psoriasissschuppen I	ohne Lipidextraktion
B	Psoriasissschuppen II	ohne Lipidextraktion, nur 1 Patient
C	Psoriasissschuppen III	ohne Lipidextraktion
D	Psoriasissschuppen IV	mit Lipidextraktion
E	Kallus	mit Lipidextraktion
F	primäre Fibroblasten	48 h $TNF\alpha$ , ohne FCS, 7. Passage
G	Fibroblasten vom Psoriatiker I	48 h $TNF\alpha$ , ohne FCS
H	Fibroblasten vom Psoriatiker II	unstimuliert, 10% FCS
I	Fibroblasten eines Neurodermitis-Patienten	unstimuliert, 10% FCS
J	primäre Keratinozyten I	Latexextrakt 48 h, ohne FCS
K	primäre Keratinozyten II	Milbenextrakt 48 h, ohne FCS
L	Keratinozyten (HaCaT)	$TNF\alpha$ 48 h, ohne FCS
M	Bronchialepithelzellen (A549)	$TNF\alpha$ / IL-4, 72 h
N	dendritische Zellen I	3-4 Tage, 1,5% autolog. Plasma
O	dendritische Zellen II	5-7 Tage, FCS + humanes Plasma
P	dendritische Zellen III	5-7 Tage, 10% FCS

**Tabelle 3:** Übersicht aller untersuchten Überstände und Extrakte

Die Extrakte und Überstände sind zur eindeutigen Identifizierung in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit mit Großbuchstaben von A bis P bezeichnet.

### 2.2.5 Chromatographische Auftrennung der Extrakte und Überstände

Für die Auftrennung der Psoriasis-Schuppenextrakte und Zellkultur-Überstände mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) wurden zwei verschiedene HPLC-Anlagen und eine Reihe unterschiedlicher Säulen verwendet. Eine Übersicht darüber ist in *Tabelle 4* dargestellt.

HPLC-Anlage 1 bestand aus einer Pumpe P4000 (Spectra Physics, Hamburg), einem Photometer Spectroflow 773 (Kratos, Hamburg) und einem Integrator PU4810 (Philips, Großbritannien).

Für Chromatographien im Mikromaßstab (Mikropore-HPLC) wurde das SMART-System der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittel, Chemikalien und das Wasser waren HPLC-rein.

Nach jeder HPLC-Reinigung (außer nach einer Heparin-Sepharose-HPLC) wurden Aliquots der daraus hervorgegangenen Fraktionen hinsichtlich ihrer Lymphozyten-chemotaktischen Aktivität untersucht. Von Fraktionen, in denen chemotaktische Aktivität für Lymphozyten gemessen werden konnte, sowie von ihren benachbarten Fraktionen wurden SDS-PAGEs angefertigt (*Kapitel 2.3.2*).



Säule	Anlage	Puffer / Laufmittel		Durchflußrate [ml/min]
		A	B	
Heparin, HiTrap, 5 ml	1	0,01 M Tris, 0,01 M Zitronensäure, pH 7,4	Laufmittel A + 2 M NaCl	1,0
C8, SP 250/10	1	0,1% TFA in H <sub>2</sub> O	0,1% TFA in Acetonitril	3,0
MonoS, PC 1.6/5	2	0,02 M NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> HCOO <sup>-</sup> , 25% Acetonitril, pH 4	Laufmittel A + 1 M NaCl	0,1
C4, Butyl, 5 µm	1	0,1% TFA in H <sub>2</sub> O	0,1% TFA in Acetonitril	0,5
TSK G2000SW 7,5 x 600	1	0,1% TFA in H <sub>2</sub> O	-	1,0
C2/C18, µRPC SC 2.1/10	2	0,1% TFA in H <sub>2</sub> O	0,1% TFA in Acetonitril, 20% H <sub>2</sub> O	0,1

**Table 4:** HPLC-Anlagen, -Säulen und -Puffer bzw. -Laufmittel

HPLC-Anlagen: 1: Pumpe Spectra Physics System P4000,  
Photometer Kratos Spectroflow 773, Integrator Philips PU4810  
2: SMART Pharmacia LKB

### 2.2.5.1 Heparin-Sepharose-HPLC

Die erste Reinigung der Extrakte bzw. Überstände wurde immer mit Hilfe einer Heparin-Sepharose-HPLC-Säule (5 ml „HiTrap“, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) an HPLC-Anlage 1 durchgeführt. Laufmittel A enthielt 0,01 M Tris (Merck) und 0,01 M Zitrat bei einem pH-Wert von 7,4. Laufmittel B bestand aus Laufmittel A mit 2 M NaCl. An der Pumpe wurde eine Durchflußrate von 1 ml/min gewählt und im Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit Laufmittel A. Dann wurde das Extrakt bzw. der Überstand aufgetragen und mit dem Sammeln der nicht Heparin-bindenden Fraktion begonnen. Nachdem die Absorption im Photometer wieder den Ausgangswert vor Probenauftrag erreicht hatte, wurde ohne Gradient auf 100% Laufmittel B gewechselt. Nun erfolgte das Sammeln des Heparin-bindenden Anteils der Probe.

### 2.2.5.2 Präparative C8-Umkehrphasen-HPLC

In einer Ultrafiltrationsrührzelle wurde die Heparin-bindende Fraktion im Volumen reduziert und mehrfach mit dem Laufmittel A, 0,1% (v/v) TFA (Merck) in Wasser, aufgefüllt. Durch Sichtprüfung (Färbung, Viskosität) wurde ermittelt, welches Volumen dieser Fraktion über die Nucleosil C8-Säule (SP 250/10 Nucleosil C8 mit Vorsäule Nucleosil 300-7 C18, Macherey-Nagel, Düren) auf HPLC-Anlage 1 getrennt werden sollte. Laufmittel B waren 0,1% (v/v) TFA in Acetonitril (J. T. Baker, Holland), die Durchflußrate betrug 3 ml/min. An der Pumpe wurde folgender Gradientenverlauf von Laufmittel A zu B programmiert: 5 min konstant 10% B,

linearer Anstieg auf 60% B innerhalb von 25 min und auf 100% B in einer Minute. Bis zum Ende der Elution nach weiteren 10 min wurden konstant 100% B programmiert. Die Messung der Absorption im Photometer erfolgte bei 215 nm.

Die Säule wurde in 90% Laufmittel A und 10% B äquilibriert und der programmierte Gradientenverlauf gestartet. Die eluierten Substanzen wurden während des Laufes manuell ihren Absorptionsgipfeln entsprechend getrennt gesammelt.

Bei der C8-Umkehrphasen-Chromatographie wurden die aufgetragenen Polypeptide mit ansteigender Hydrophobizität eluiert. „Präparativ“ hieß in diesem Fall, daß die Säule mit einer große Menge hydrophober Substanzen beladen werden konnte, so daß eine für die Messungen chemotaktischer Aktivität und weitere Reinigungsschritte ausreichende Menge an Polypeptiden zur Verfügung stand.

### **2.2.5.3 Mikropore Kationenaustausch-HPLC**

Fractionen mit Lymphozyten-chemotaktischer Aktivität aus der C8-Umkehrphasen-HPLC wurden über eine MonoS-Kationenaustausch-Säule (PC 1.6/5, Pharmacia) in der SMART-Anlage getrennt. Laufmittel A für die MonoS-HPLC-Säule bestand aus 20 mM Ammoniumformiat in Wasser, pH 4, mit 25% (v/v) Acetonitril. Laufmittel B enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Die Durchflußrate betrug 100 µl/min. Folgender Gradientenverlauf wurde programmiert: In den ersten 3 Minuten konstant 0% B, dann innerhalb von 20 min ein linearer Anstieg auf 100% B. Bis zum Ende der Elution nach 25 min wurden 100% B beibehalten. Entsprechend der Absorption bei 280 nm im Chromatogramm wurden die Fractionen eingeteilt und mit Hilfe eines Fractionensammlers in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) aufgefangen.

In der Kationenaustausch-Chromatographie wurden die Polypeptide mit ansteigender positiver Ladung eluiert.

### **2.2.5.4 C4-Umkehrphasen-HPLC**

Im Anschluß an die Trennung mit Kationenaustausch-HPLC folgte in den meisten Fällen die Umkehrphasen-HPLC über eine C4-Säule („Wide-Pore“ Butyl, 5 micron, J. T. Baker, HPLC-Anlage 1). Laufmittel waren 0,1% (v/v) TFA in Wasser (A) bzw. in Acetonitril (B). Die Durchflußrate betrug 0,5 ml/min und die Messung der Absorption im Photometer fand bei einer Wellenlänge von 215 nm statt. An der Pumpe wurde folgender Gradientenverlauf von Laufmittel A zu B programmiert: In den ersten 10 min ein linearer Anstieg von 10 auf 40% B, dann in 20 min auf 70% B und in weiteren 10 min auf 100% B.

Die Säule wurde mit 10% Laufmittel B äquilibriert. Die Fractionen wurden von Hand entsprechend des Absorptionsverlaufes getrennt in 5 ml-Röhrchen gesammelt.

In zwei Fällen wurde nach der Kationenaustausch-HPLC eine Gelfiltrations-HPLC durchgeführt. Bei der C4-Umkehrphasen-HPLC erfolgte eine Auftrennung nach Hydrophobizität, jedoch durch die andere Zusammensetzung der festen Phase mit im Vergleich zur C8-Säule veränderter Spezifität.

### 2.2.5.5 Gelfiltrations-HPLC

Für die Reinigung mit Hilfe einer Gelfiltrations-Säule TSK G2000SW (7,5 x 600 mm, LKB, Schweden) war nur ein Laufmittel notwendig, in diesem Fall 0,1% (v/v) TFA in Wasser. Die Durchflußrate wurde zu Beginn in Schritten von 0,2 ml/min auf 1 ml/min gesteigert. Die Messung der Absorption im Photometer erfolgte bei 215 nm Wellenlänge.

Nachdem die Säule mit 1 ml/min für mindestens 45 min gespült worden war, wurde die Probe in einem kleinen Volumen (~100 µl, Volumenreduktion zuvor in der Vakuum-Zentrifuge VR-1, Heto Lab Equipment, Dänemark) aufgetragen. Die Fraktionen zu je 1 ml wurden automatisch mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Cygnet Isco, USA) aufgefangen.

Die Gelfiltrationschromatographie, bei der nur ein Laufmittel verwendet wurde, trennte Polypeptide ihrer Größe und der Anzahl ihrer Ladungen nach auf<sup>34</sup>. Ähnlich wie in der SDS-PAGE benötigten hier längere Aminosäureketten mehr Zeit, um durch das Gel in der Säule hindurch zu gelangen. Bei gleichem Molekulargewicht wurden diejenigen Moleküle früher eluiert, die einen höheren Anteil basischer Aminosäuren enthielten.

### 2.2.5.6 Mikropore C2/C18-Umkehrphasen-HPLC

In einem Fall wurde nach der Gelfiltrations-HPLC eine Umkehrphasen-HPLC mit einer C2/C18-Säule (µRPC C2/C18 SC 2.1/10, Amersham Pharmacia Biotech) an der SMART-Anlage durchgeführt. Laufmittel waren 0,1% (v/v) TFA in Wasser (A) und in Acetonitril mit 20% (v/v) Wasser (B). Die Durchflußrate betrug 100 µl/min. Folgender Gradientenverlauf von Laufmittel A zu B wurde programmiert: Ein linearer Anstieg von 0 auf 25% B in den ersten 10 min, in 30 min auf 70% B und in weiteren 10 min auf 100% B (Ende der Elution). Entsprechend der Absorption bei 280 nm im Chromatogramm wurden die Fraktionen eingeteilt und mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Die C2/C18-Umkehrphasen-HPLC trennte nach hydrophoben Eigenschaften der Polypeptide, wiederum mit gegenüber C8- und C4-Umkehrphasen-HPLC veränderter Spezifität.

## 2.3 Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakten auf Antikörper gegen bekannte Lymphozyten-Chemokine

In Psoriasis-Schuppenextrakten wurde mit Hilfe entsprechender Antikörper nach bereits bekannten Chemokinen für Lymphozyten gesucht.

### 2.3.1 Enzymgebundener Immunoassay (ELISA)

Die Bestimmung der Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakten auf verschiedene Antikörper erfolgte mit HPLC-gereinigten Fraktionen der Extrakte in Festphasen-ELISAs. Die Proben wurden dabei an eine Mikrotiter-Platte (96-well ImmunoSorb, Nunc), die Festphase, gebunden, indem Aliquots der Proben zu je 100 µl Beschichtungspuffer (50 mM Natriumkarbonat-Puffer, pH 10,6) in die Vertiefungen der Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Als Positivkontrolle diente das jeweils gesuchte rekombinant-humane Antigen, als Negativkontrolle wurde PBS verwendet.

Am folgenden Tag wurden die Vertiefungen 1mal mit PBS / Tween20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaurat 0,05% v/v, Sigma) gespült, je Vertiefung 200 µl PBS / BSA (1% w/v) eingefüllt und bei Raumtemperatur für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS / Tween20 wurde der primäre Antikörper jeweils in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (siehe *Tabelle 5*) mit PBS in die Vertiefungen gefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach folgte das 3malige Spülen der Platte mit PBS / Tween20.

Je 100 µl eines sekundären, Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch / Dianova, Hamburg) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Danach erfolgte 4maliges Spülen mit PBS / Tween20. 10 mg OPD (Sigma) wurden in 20 ml OPD-Substratlösung (17 mM Zitronensäure, 33 mM di-Natriumhydrogenphosphat, pH 5,2) aufgelöst, 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben und pro Vertiefung 100 µl dieser Lösung eingefüllt. Nachdem die Positivkontrolle eine deutlich sichtbare Färbung hatte und bevor die Negativkontrolle farbig wurde, erfolgte das Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6% v/v in destilliertem Wasser) pro Vertiefung. Die Extinktion wurde photometrisch bei 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt (Mikrotiterplatten-Photometer SLT 210, Kontron, Crailsheim).

Positive Fraktionen wurden in der HPLC weiter aufgereinigt oder im „Western Blot“ analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität der primären Antikörper wurden diese in einem Experiment durch Kaninchen-Normalserum (1:10 und 1:50 in PBS) ersetzt.

spezifisches Antigen	eingesetzte Verdünnung
<i>primäre Antikörper gegen</i>	
CCL19	1: 8000
CCL2	1: 4000
CXCL12 $\alpha$	1: 8000
CXCL12 $\beta$	1: 200
CCL17	1: 8000
CXCL11	1: 2000
CXCL9	1: 32000
CCL20	1: 8000
CCL18	1: 16000
CCL21	1: 16000
CCL25	1: 2000
CX <sub>3</sub> CL1	1: 4000
XCL1	1: 1000
<i>sekundärer Antikörper</i>	
Ziege anti-Kaninchen IgG	1: 5000

**Tabelle 5:** Antikörper für ELISA, „Western Blots“ und „Dot Blots“

Alle o. a. Antikörper waren polyklonal. Sie wurden wie angegeben verdünnt. Die Antigene zu den primären Antikörpern waren rekombinant-human. Die primären Antikörper stammten von PeproTech, der sekundäre von Jackson ImmunoResearch.

### 2.3.2 Charakterisierung von Polypeptiden in der SDS-PAGE

Einige der zuvor in einem ELISA getesteten HPLC-Fractionen wurden nachfolgend hinsichtlich der Größe der in ihnen enthaltenen Proteine und Polypeptide analysiert. Zur Auftrennung von Proteinen und Polypeptiden in der SDS-PAGE wurden, je nach erforderlicher Auflösung, zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Für kleine Gele (ca. 4,3 x 5,0 cm) wurde das PHAST-System (Pharmacia), für große (ca. 9,5 x 7,0 cm) mit entsprechend höherer Auflösung das BioRad-System (Mini Protean II und Power Pac 3000, BioRad, USA) nach SCHÄGGER & v. JAGOW<sup>35</sup> eingesetzt.

#### 2.3.2.1 PHAST-System

In den meisten Fällen wurden die Polypeptide der Lymphozyten-chemotaktisch aktiven HPLC-Fractionen mit Hilfe von SDS-PAGE unter Verwendung eines PHAST-Systems und „High Density“-Gelen (Amersham Pharmacia Biotech) dargestellt. Dazu wurden je 20  $\mu$ l Probe mit 1  $\mu$ l Probenpuffer (Blue G, Ansatz nach Vorschrift des Herstellers, Serva, Heidelberg) gefriergetrocknet und dann in 1  $\mu$ l Wasser resuspendiert. Stammen die Proben aus einer Mikropore-HPLC, wurden je 1-2  $\mu$ l der Probe mit 1  $\mu$ l Probenpuffer vermischt und direkt aufgetragen. Als Größenstandart wurde MW SDS 17S von Sigma verwendet.

Die in den fertigen Gelen aufgetrennten Polypeptide wurden entweder im „Western Blot“ auf ihre Immunoreaktivität hin untersucht oder durch eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK<sup>36</sup> angefärbt.

### 2.3.2.2 BioRad-System für SDS-PAGE

War eine höhere Auflösung zur Unterscheidung der Polypeptid-Banden erforderlich, wurden SDS-PAGEs mit Gelen der Größe 9,5 x 7,0 cm, 46% Acrylamid und 8 M Harnstoff unter Verwendung des BioRad-Systems angefertigt.

Je 10-30µl der Proben (Mikropore-HPLC-Fractionen: 1-3µl) wurden mit 10µl Probenpuffer (siehe *Kapitel 2.3.2.1*) im Wasserbad eingekocht und in 10 µl Wasser aufgenommen. Als Größenstandart wurde auch hier MW SDS 17S verwendet.

Die in den fertigen Gelen aufgetrennten Polypeptide wurden durch eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK<sup>36</sup> entsprechend der Vorschrift des Herstellers der Färbereagenzien (Sigma) angefärbt.

### 2.3.3 „Western Blot“

Die optimale Konzentration der im „Western Blot“ (modifiziert nach TOWBIN *et al.*<sup>37</sup>) mit PHAST-Gelen verwendeten Antikörper wurde zuvor mit Hilfe von „Dot Blots“ (*Kapitel 2.3.4*) ermittelt.

Im Prinzip sind zwischen Antikörpern und einigen Proteinen nicht-Antigen-spezifische Bindungen möglich. Daher wurden jeweils zwei identisch mit Proben belegte „Western Blots“ angefertigt. Einer wurde wie im folgenden beschrieben mit primärem und sekundärem Antikörper inkubiert, der andere zur Kontrolle der Spezifität des sekundären Antikörpers mit TBS anstelle des primären Antikörpers. Trat hier eine Färbung auf, so wurde der sekundäre Antikörper in geringerer Konzentration eingesetzt, um nicht-Antigen-spezifische Proteinbindung zu vermeiden.

Das PHAST-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE mit Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin in destilliertem Wasser mit 20% (v/v) Methanol, pH 8,3) für 5 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Der Transfer der Polypeptide auf eine Nitrozellulose-Membran (Pure Nitrocellulose, BioRad) erfolgte im PHAST-System entsprechend der Vorschrift des Geräteherstellers (Pharmacia).

Nach dem Transfer wurde die Membran 2mal in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl in destilliertem Wasser, pH 7,5) gespült und danach für 1 h in 1%iger Blockierlösung (Chemiluminescence Detection Kit, Boehringer Mannheim, 1:10 in TBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in der zuvor im „Dot Blot“ als optimal ermittelten Verdünnung in 0,5%ige Blockierlösung gegeben und die Membran damit über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Membran 2mal in TBST (TBS + 0,1% (v/v) Tween20) und 2mal in 0,5%iger Blockierlösung für je 10 min. Der sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Jackson ImmunoResearch) wurde mit der zuvor im „Dot Blot“ als optimal ermittelten Verdünnung in 0,5%ige Blockierlösung gegeben und die Membran damit für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Färbung der Membran mit Luminol (Chemiluminescence Detection Kit, Boehringer Mannheim) erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Lichtabgabe des Luminols wurde auf Filmmaterial (Hyperfilm-ECL, Amersham Pharmacia Biotech) dargestellt.

#### **2.3.4 „Dot Blots“ von Psoriasis-Schuppenextrakten**

Als Antigen wurden Proben aus einer C8-Umkehrphasen-HPLC von Psoriasis-Schuppenextrakt getestet. Es wurden Antikörper gegen CCL19, CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$ , CCL17, CXCL11, CXCL9, CCL20, CCL18, CCL21, CCL25, CX<sub>3</sub>CL1 sowie XCL1 verwendet. Die eingesetzten Verdünnungen dieser Antikörper sind in *Tabelle 5* zusammengefaßt.

Nitrozellulose-Membranen (Pure Nitrocellulose, BioRad oder ImmobilonP, Millipore, USA) wurden im Format 7,5 x 10,0 cm ausgeschnitten und auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gepreßt, um für den Probenauftrag Abdrücke in gleichmäßigen Abständen zu erhalten. Sie wurden kurz in Methanol getaucht, 2mal in destilliertem Wasser und 2mal in TBS gewaschen. Dann erfolgte das Auftragen der Proben (je 1  $\mu$ l) und Kontrollen (je 1-6  $\mu$ l). Als Kontrolle für ein positives Ergebnis wurden ca. 50 ng des zum Antikörper spezifischen Antigens (rekombinant-human, *Tabelle 5*) gewählt. Als Kontrollen für negative Ergebnisse bzw. nicht-Antigen-spezifische Bindung wurden RPMI-FCS, 50% (v/v) Acetonitril in destilliertem Wasser sowie verschiedene andere rekombinante Chemokine aufgetragen. Das Eintrocknen der Proben und Kontrollen auf dem Filter erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Eine Blockierung, die Antikörpermarkierung und die Chemilumineszenz-Färbung erfolgten, wie für den „Western Blot“ beschrieben.

### 3 Ergebnisse

Eine Darstellung von den mit der beschriebenen Methodik erzielten Ergebnissen erfolgt in drei Abschnitten: In *Kapitel 3.1* werden die getesteten Parameter für den Chemotaxisassay dargestellt und eine Übersicht der optimalen Testbedingungen gegeben. *Kapitel 3.2* zeigt die Ergebnisse aus den chemotaktischen Messungen der verwendeten Extrakte und Überstände. Die Chromatogramme einer Sequenz von aufeinander folgenden HPLC-Trennungen werden graphisch wiedergegeben. *Kapitel 3.3* beinhaltet die Ergebnisse aus den Messungen von Immunreaktivität in Extrakten von Psoriasis-Hautschuppen. Eine Sequenz aufeinander folgender HPLC-Chromatogramme wird zusammen mit der Immunreaktivität in den einzelnen Fraktionen dargestellt. Mit Hilfe von SDS-PAGE und „Western-Blot“ werden Befunde aus den Immunfärbungen geklärt. Es folgen Darstellungen der Ergebnisse aus „Dot Blot“-Analysen von Psoriasis-Hautschuppenextrakten.

#### 3.1 Optimierung der verschiedenen Parameter zur Messung chemotaktisch stimulierter Migration von Lymphozyten

Die im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienten der Verbesserung von Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der chemotaktischen Messungen mit Lymphozyten. Dazu wurden die folgenden Parameter variiert: Isolierung, Kultur und Stimulation der Testzellen (*Kapitel 3.1.1*), Art der Filtermembranen und ihre Vorbehandlung (*Kapitel 3.1.2*), Positivkontrollen (*Kapitel 3.1.3*), Dichte der eingesetzten Zellen, Auswahl des Mediums, in welchem die chemotaktisch stimulierte Migration stattfand, Inkubationsdauer (*Kapitel 3.1.4*) sowie die Fixierung der gewanderten Zellen am Filter und deren Färbung (*Kapitel 3.1.5*).

Am Beginn standen Untersuchungen mit der T-Zelllinie HuT78 (*Kapitel 3.1.1.1*), da hier Spender-unabhängig konstante Bedingungen in der Expression von Oberflächenrezeptoren und chemotaktischer Aktivität der Zellen zu erwarten waren. Später wurden aus Blutspenden von je 240 (Vollblut) oder 450 ml („Buffy Coat“) periphere Blutlymphozyten isoliert (*Kapitel 3.1.1.2*) und entweder sofort auf ihre chemotaktische Aktivität getestet oder zuvor für 1-3 Tage kultiviert. Aus weiteren Blutspenden wurden periphere Blut-mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und daraus durch spezielle Kulturbedingungen Th1-Lymphozyten angereichert (*Kapitel 3.1.1.3*), die ebenfalls für Chemotaxisexperimente verwendet wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 573 Chemotaxisfilter mit je 48 Feldern für die Optimierung des Testsystems und die Analyse der HPLC-Fraktionen ausgewertet. Eine vollständige Abbildung aller Filter im Rahmen dieser Dissertation erscheint nicht sinnvoll. Im folgenden wird daher eine Zusammenfassung der optimierten Chemotaxisparameter gegeben, die lediglich beispielhaft mit der Darstellung von Einzeldaten untermauert wird.

Eine Übersicht der optimierten Parameter für die Chemotaxisexperimente ist in *Tabelle 7* am Ende dieses Kapitels dargestellt.



### 3.1.1 Isolierung, Kultur und Stimulation der Zellen

Als Kulturmedium wurde für alle drei Zellpopulationen RPMI1640 mit 10% FCS, 100 IU/ml Penicillin-Streptomycin und 2 mM L-Glutamin verwendet (als RPMI-FCS bezeichnet). Der Zusatz von 25 mM HEPES zum RPMI-FCS verzögerte ein Ansteigen des pH-Wertes in den für die Zellen ungünstigen basischen Bereich ( $> \text{pH } 8,0$ ).

#### 3.1.1.1 Die T-Zelllinie HuT78

Die Kultur von HuT78-Zellen mit Phytohaemagglutinin A (PHA) und bzw. oder IL-2 führte zu keiner sichtbaren Verbesserung der chemotaktischen Aktivität. Bei Anwesenheit von PHA im Medium sank außerdem die Vitalität der Zellen (2 Tage Kultur; PHA 0,5  $\mu\text{g/ml}$ : 83% vital; 1  $\mu\text{g/ml}$ : 78% vital; 2  $\mu\text{g/ml}$ : 76% vital). Optimale chemotaktische Ergebnisse wurden mit unstimulierten HuT78-Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen erreicht.

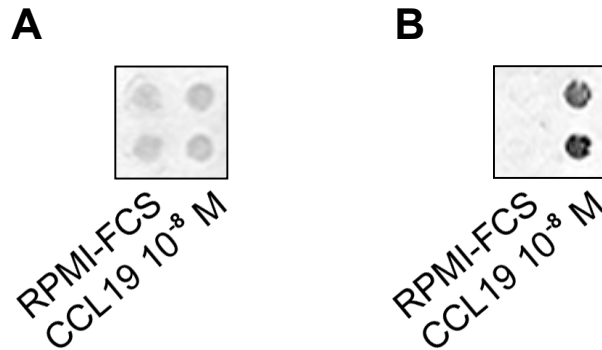
Die Zelldichte in der Kultur sollte laut „European Collection of Cell Cultures“, von denen die Zellen stammten, zwischen  $3$  und  $9 \times 10^5$  Zellen pro ml Kulturmedium liegen. Dichten bis  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml waren jedoch ohne Beeinträchtigung der chemotaktischen Aktivität möglich. Bei höheren Zelldichten war die Zufuhr von frischem Medium alle 1-2 Tage notwendig.

#### 3.1.1.2 Periphere Blutlymphozyten

Frisch isolierte periphere Blutlymphozyten (PBL), welche direkt nach der Reinigung unstimuliert für die Chemotaxis eingesetzt wurden, zeigten keine chemotaktische Aktivität mit den getesteten Chemokinen (genannt in *Kapitel 3.1.3*). Daher mußten die isolierten PBL für einige Tage kultiviert werden. Eine sterile Durchführung der Reinigung von PBL aus Vollblut oder „Buffy Coats“ durch Elutriation bereitete zunächst Schwierigkeiten. Die Zellen waren nach einigen Tagen in Kultur häufig mit Pilzhyphen kontaminiert.

Kontaminationsfreie Zellen wurden daher zunächst mit Hilfe des „Pan-T-Cell Isolation Kits“ über das MACS-System (*Kapitel 2.1.1.2.1*) gewonnen. Pro Säule konnten so aber nur Lymphozyten aus maximal  $10^8$  PBMC gereinigt werden. Durch eine Behandlung des Elutriatorsystems mit 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Amphotericin B gelang es schließlich doch, eine Elutriation ohne Pilzkontamination zu etablieren, so daß nach 3 Tagen in Kultur bis zu  $5 \times 10^8$  Lymphozyten pro „Buffy Coat“ für die chemotaktischen Untersuchungen zur Verfügung standen.

In der 2-3-tägigen Kultur wurden die PBL entweder mit IL-2 oder mit PHA stimuliert. Beides brachte Zellen mit vergleichbar geringer chemotaktischer Aktivität hervor. Die Vitalität der PBL nach Kultur mit PHA war mit der nach IL-2-Kultur vergleichbar. PHA hatte also unter den getesteten Bedingungen auf PBL, anders als auf Zellen der Linie HuT78, keine toxische Wirkung. Durch 2-tägige Kultivierung mit einem am Boden der Kulturflasche heftenden Antikörper gegen den T-Zellrezeptor (CD3), OKT3 genannt, konnten die PBL zu deutlich höherer chemotaktischer Aktivität stimuliert werden (*Abbildung 3*).



**Abbildung 3:** Vergleich chemotaktisch stimulierter Migration von PBL zwischen IL-2- und OKT3-kultivierten Zellen

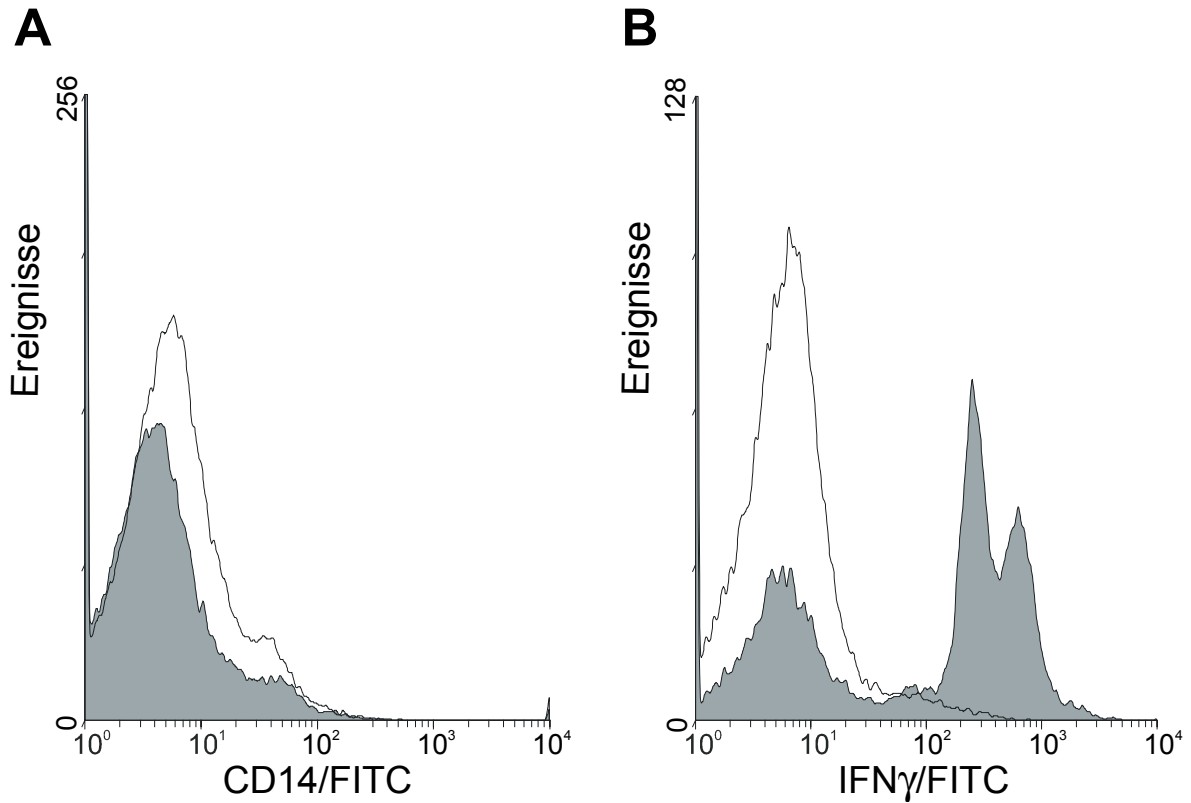
**A** zeigt den gefärbten Filter einer Chemotaxis mit peripheren Blutlymphozyten, die für 2 Tage mit IL-2 (100 U/ml) stimuliert wurden, **B** einen Chemotaxisfilter nach 2-tägiger Stimulation der PBL mit OKT3. Jeweils links wurde Kulturmedium (RPMI-FCS) als Negativkontrolle eingesetzt, rechts CCL19  $10^{-8}$  M, die Positivkontrolle für die chemotaktischen Untersuchungen dieser Arbeit. Zu sehen ist eine deutlich bessere Unterscheidbarkeit zwischen CCL19 und Mediumkontrolle bei den OKT3-stimulierten PBL gegenüber den mit IL-2 stimulierten, wobei *Abbildung 3 A* dunkler dargestellt ist, um die schwache Färbung des Filters überhaupt erkennbar zu machen.

### 3.1.1.3 Th1-Lymphozyten

Die Anreicherung von Th1-Zellen aus peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte in drei Stufen (modifiziert nach BONECCHI *et al.*<sup>30</sup>):

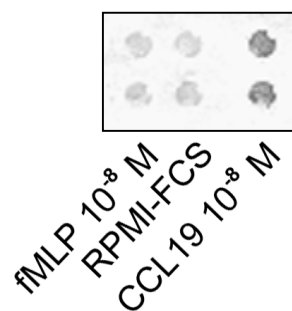
1. Die Kultur der PBMC in RPMI-FCS ohne weitere Zusätze für 1-3 h in einem Gefäß mit großer Bodenfläche bei 37 °C bewirkte das Anheften eines großen Teils der enthaltenen Monozyten. Vorsichtiges Überführen der nicht anheftenden Zellen in ein neues Gefäß führte zu einer Reduktion der Monozyten auf ca. 10% aller Zellen.
2. Die nachfolgende Kultur für 2-3 Tage führte zur Th1-Anreicherung. IL-12 im Medium bewirkte dabei eine Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Lymphozyten. Ein Antikörper gegen IL-4 verminderte die Menge an frei im Medium verfügbarem IL-4 (gebildet von CD4<sup>+</sup>- und einigen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen), welches sonst eine Differenzierung zu Th2-Lymphozyten gefördert hätte. Das PHA hatte eine proliferationsfördernde und generell aktivierende Wirkung auf die Lymphozyten.
3. Die Kultivierung mit IL-2 für weitere 3-6 Tage bewirkte eine Fortsetzung der Proliferation und Aktivierung aller vorhandenen T-Lymphozyten.

Durchflußzytometer-Analysen zur Expression von CD14 sowie zur Sekretion von IFN- $\gamma$  bewiesen den Erfolg einer Th1-Anreicherung auf einen Anteil von ca. 60-65% der Zellen in Kultur. In allen Fällen war am Ende der Kultivierung keine CD14-Expression der Zellen im Durchflußzytometer meßbar (*Abbildung 4*). Mit n-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), einem Chemotaxin für Monozyten, nicht aber für T-Zellen, war bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M keine chemotaktische Aktivität der Zellen feststellbar (*Abbildung 5*). Die beschriebenen Kulturbedingungen führten folglich zu einer vollständigen Entfernung der zu Beginn enthaltenen Monozyten aus der Zellkultur.



**Abbildung 4:** Analysen Th1-angereicherter PBMC im Durchflußzytometer

**A** zeigt die durchflußzytometrische Messung von PBMC nach Markierung mit FITC-gekoppeltem anti-CD14 (Linie über der grauen Fläche). Die zugehörige Isotypenkontrolle (IgG2b) ist als Linie über der weißen Fläche dargestellt. CD14-Antigen ist nicht nachweisbar. **B** zeigt die Messung nach Behandlung der Zellen mit „IFN- $\gamma$ -catch-Reagent“ und nachfolgender Markierung mit FITC-gekoppeltem Antikörper gegen IFN- $\gamma$ . Die Linie über der grauen Fläche gibt die Markierung OKT3-stimulierter Zellen wieder, die andere Linie die der nicht OKT3-stimulierten PBMC (anstelle einer Isotypenkontrolle, siehe Kapitel 2.1.1.3.2). Zu erkennen ist ein deutliches IFN- $\gamma$ -Signal bei ca. 65% der OKT3-stimulierten Zellen.



**Abbildung 5:** Chemotaktische Aktivität von Th1-Lymphozyten für fMLP

Die Abbildung zeigt den Filter einer Th1-Lymphozytenchemotaxis nach Kultur der Zellen für 5 Tage (3 Tage PHA, IL-12, anti-IL-4; 2 Tage IL-2). Links wurde fMLP  $10^{-8}$  M eingesetzt, in der Mitte RPMI-FCS und rechts CCL19  $10^{-8}$  M. fMLP ruft keine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte chemotaktische Aktivität hervor.

### 3.1.2 Chemotaxisfilter und ihre Auswertung

Zellen der Linie HuT78 haben ungefähr den doppelten Durchmesser (ca. 15-20  $\mu\text{m}$ ) im Vergleich zu Blut-Lymphozyten (8-10  $\mu\text{m}$ ). Dennoch ergaben Filter mit nur 5  $\mu\text{m}$  Porengröße in beiden Fällen gute Chemotaxisresultate. Um ein Anheften der Zellen an der Unterseite der Filter zu begünstigen, wurden die Filter vor der Chemotaxismessung beschichtet. Die besten Chemotaxisresultate wurden erreicht, wenn die Filter auf ihrer glatten Seite beschichtet und damit zum unteren Kompartiment der Kammer hin orientiert waren. Zur Beschichtung wurden die Filter für 2 h auf die Oberfläche von 10 ml humanem Plasma in einer Petrischale aufgelegt. Eine weitere Verbesserung der Chemotaxisergebnisse konnte durch Beschichtung der Filter mit humanem Kollagen Typ IV (50 ng in 5 ml destilliertem Wasser) für 2 h erzielt werden. Filterbeschichtungen mit Maus-Kollagen Typ IV erwiesen sich für die Chemotaxisexperimente als ungeeignet. Eine Beschichtung der rauhen Seite des Filters, die Orientierung der Beschichtung nach oben oder beidseitiges Beschichten verschlechterte die chemotaktisch stimulierte Migration der Testzellen z. T. erheblich. Die Verwendung von Filtern mit 8  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser lieferte unspezifische, d. h. falsch positive Resultate in der Chemotaxis. Eine Erhöhung anionischer Ladungen auf der Filteroberfläche durch Vorbehandlung mit 1 M NaOH in 50% Ethanol für 30 min, die zu einer besseren Anheftung von Chemokinen an den Filter führen sollte, brachte keine Verbesserung der Chemotaxisresultate.

Bei vorangegangenen Arbeiten zur Chemotaxis von Monozyten wurden die Chemotaxisfilter densitometrisch gemessen, um das Maß der chemotaktischen Aktivität in den einzelnen Proben zu quantifizieren<sup>26</sup>. In den Untersuchungen zu dieser Arbeit stellte sich heraus, daß Lymphozyten nach der chemotaktischen Migration erheblich schwächer an den Filtern anhafteten, als dies bei Monozyten der Fall war. Aufgrund von Scherkräften beim Abheben der Filter von den Kammerunterteilen und beim Fixieren und Färben entschied hier die Handhabung der Filter mit über das Maß der Filterfärbung auf den einzelnen Feldern. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Filter in den Tests zur Lymphozytenchemotaxis durch visuelle Begutachtung durchgeführt. Hierbei war der Vergleich mit den Positiv- und Negativkontrollen entscheidend, die stets an mehreren verschiedenen Positionen der Chemotaxiskammern eingefüllt wurden. Die zu testenden HPLC-Fractionen wurden jeweils an zwei untereinander liegenden Positionen aufgetragen. War die Filterfärbung an beiden Positionen einer HPLC-Fraktion genauso schwach gefärbt wie an denen der Negativkontrollen, so wurde diese Fraktionen als *nicht positiv* bezeichnet. Die stärksten im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Färbungen wurde mit der Positivkontrolle,  $10^{-8}$  M CCL19 (ELC) erreicht. Daher wurden Proben, bei denen mit der Positivkontrolle vergleichbare Filterfärbungen auftraten, als *stark positiv* bewertet. Lag die Färbeintensität zwischen der von Positiv- und Negativkontrollen, so lautete der Befund *positiv*. Widersprachen die beiden Felder derselben Probe einander im Färbeergebnis, war also ein Feld mit positiv, das andere mit nicht positiv bewertet, so wurde die Probe als *nicht reproduzierbar positiv* eingestuft.

### 3.1.3 Chemotaktische Aktivität für bereits bekannte Chemokine

Neben den chemotaktischen Tests der HPLC-gereinigten Fraktionen von verschiedenen Extrakten und Überständen wurden eine Reihe von bereits bekannten Chemokinen in ihrer chemotaktischen Wirksamkeit auf HuT78-Zellen sowie auf periphere und Th1-angereicherte Blutlymphozyten getestet, auch um eine geeignete Positivkontrolle für die Chemotaxisexperimente zu finden.

Alle drei untersuchten Zellpopulationen zeigten für CCL19 in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M die größte chemotaktische Aktivität. Es wurde daher als Positivkontrolle eingesetzt. Eine Aktivität für CCL19 war auch noch bei  $10^{-9}$  M eindeutig meßbar. In noch geringeren Konzentrationen konnte keine Chemotaxis für CCL19 gemessen werden.

HuT78-Zellen zeigten auch für CCL17 bei  $10^{-8}$  M eine hohe und bei  $10^{-9}$  M eine noch meßbare Aktivität. Chemotaktische Aktivität bei niedrigeren CCL17-Konzentrationen konnte nicht gemessen werden. Bei PBL und Th1-Lymphozyten konnte unter den getesteten Bedingungen keine chemotaktische Aktivität für CCL17 festgestellt werden.

PBL zeigten für CXCL12 $\alpha$  in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M hohe und  $10^{-9}$  M geringe chemotaktische Aktivität. Mit Th1-Lymphozyten konnte für CXCL12 $\alpha$  nur bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M Chemotaxis gemessen werden.

Th1-Lymphozyten zeigten für CXCL12 $\beta$  mittlere chemotaktische Aktivität bei  $10^{-8}$  M und in einem Fall geringe bei  $10^{-9}$  M.

Bei keiner der drei Zellpopulationen konnten chemotaktische Aktivitäten für C5a, CCL2, CCL5 und CXCL8, jeweils getestet in den Konzentrationen  $10^{-7}$  bis  $10^{-14}$  M, gemessen werden (Abbildung 6 und Tabelle 6).

Zellen	HuT78-Zellen			PBL (OKT3-stimuliert)			Th1-Lymphozyten		
	K	$10^{-8}$	$10^{-9}$	K	$10^{-8}$	$10^{-9}$	K	$10^{-8}$	$10^{-9}$
CCL19									
CXCL12 $\alpha$	n. g.								
CXCL12 $\beta$	n. g.			n. g.					
CCL17				Ø			Ø		

**Abbildung 6:** Chemotaktische Aktivität der drei untersuchten Zellpopulationen für einige Chemokine

Die Abbildung zeigt Chemotaxisfilter von HuT78-Zellen, OKT3-stimulierten peripheren Blutlymphozyten und Th1-Zellen, auf denen chemotaktische Aktivität für einige Chemokine zu erkennen war.

K: Negativkontrolle mit RPMI-FCS; Ø: keine chemotaktische Aktivität meßbar; n. g.: nicht getestet

Zellen Chemokin	HuT78-Zellen		PBL (OKT3-stimuliert)		Th1-Lymphozyten	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
C5a	∅	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-14</sup>	n. g.		n. g.	
CCL19	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-16</sup>	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
CCL2	∅	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-14</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-11</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>
CCL5	∅	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-14</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>	n. g.	
CCL17	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-16</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>
CXCL12 $\alpha$	n. g.		10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-10</sup>
CXCL12 $\beta$	n. g.		n. g.		10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-10</sup>
CXCL8	∅	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-14</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-11</sup>	∅	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-10</sup>

**Tabelle 6:** Übersicht chemotaktischer Aktivität der drei untersuchten Zellpopulationen für alle getesteten Chemokine

In der Tabelle sind die in den Chemotaxisexperimenten getesteten Konzentrationen der Chemokine in mol/l (M) angegeben. Alle Chemokine sind rekombinant-human. Als positiv wurde eine chemotaktische Aktivität eingestuft, wenn auf mindestens einem Filter beide Felder mit einem Chemokin in der angegebenen Konzentration stärker gefärbt waren als die Negativkontrolle (Medium) des selben Filters.

∅ : keine chemotaktische Aktivität meßbar; n. g.: nicht gemessen

### 3.1.4 Die chemotaktisch stimulierte Migration

Bei allen drei getesteten Zellpopulationen (HuT78, PBL und Th1-Lymphozyten) erwies sich eine Zellzahl von  $8 \times 10^6$  Zellen pro ml als optimal für die Chemotaxisuntersuchungen. Der größte Unterschied zwischen zufälliger und stimulierter Migration, also die maximale Spezifität der Chemotaxisexperimente, wurde nach einer Inkubation der Kammern von 90 min Dauer bei 37 °C erreicht. Kürzere Inkubationszeiten ergaben insgesamt zu schwache Färbungen der Filter, längere in vielen Fällen eine zunehmende Färbung der Negativkontrolle (RPMI-FCS).

In einer Schachbrettanalyse<sup>31</sup> wurde Chemokin in die obere und die untere Kammer gegeben. Mit Hilfe dieser Analyse sollte geklärt werden, ob die Zellen Chemokinese, d. h. stimulierte, aber ungerichtete Migration, oder Chemotaxis, also die stimulierte Migration entlang eines Gradienten, zeigten. Sie ergab, daß keine der in dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen eine erkennbare, d. h. von der Mediumkontrolle unterscheidbare, Chemokinese mit CCL19  $10^{-8}$  M zeigten.

### 3.1.5 Fixierung und Färbung der Zellen an der Filtermembran

Die Färbeergebnisse bei Verwendung der Färbereihe Hämatoxyllin/HCl-Ethanol/Bläulösung unterschieden sich nicht von denen des Diff-Quik-Färbesets. Essentiell für ein Gelingen der Experimente war hingegen die ausgesprochen vorsichtige Handhabung der Filter, vor allem beim Öffnen der Chemotaxiskammern, beim Abheben der Filter vom unteren Kammerteil sowie beim Auflegen der Filter auf die Oberfläche der Fixierlösung. Scherkräfte an der Filterunterseite mußten unbedingt vermieden werden, da die nur sehr schwach haftenden gewanderten Zellen sonst abgeschwemmt wurden. Das kurze Trocknen der Filter an der Luft (ca. 10 min) vor

Fixierung und Färbung führte zu besonders guten Ergebnissen. Eine Fixierung der Zellen für 30 Sekunden mit Methanol oder der methanolhaltigen Fixierlösung des „Färbesets“ nach dem Trocknen genügte.

### 3.1.6 Die optimierten Parameter

Nach Optimierung ergaben sich Unterschiede zwischen den Chemotaxisparametern der drei Zellpopulationen für die Kultivierung und Stimulation der Zellen. Die Parameter der eigentlichen Chemotaxis waren nach ihrer Optimierung sowohl für HuT78-Zellen als auch für periphere Blutlymphozyten und Th1-Lymphozyten identisch. Eine Zusammenfassung aller optimierten Parameter aus den vorangegangenen Kapiteln ist in *Tabelle 7* dargestellt.

<i>Parameter</i>		<i>optimierte Bedingung</i>
Kultivierung / Stimulation	HuT78	unstimuliert, aus exponentiell wachsender Kultur
	PBL	3 d Kultur, 6-24 h OKT3-beschichteter Kulturflaschenboden (10 µg/ml, 10 ml)
	Th1-Zellen	2 d Kultur in PHA (1 µg/ml), IL-12 (rek.-human, 2 ng/ml) und anti-human IL-4 (0,2 µg/ml), dann 3 d Kultur in IL-2 (100 U/ml)
Zellzahl pro Loch (in 50 µl)		$4 \times 10^5$
Inkubationsdauer		90 min
Filter: Porengröße, Beschichtung		5 µm, auf der Unterseite mit humanem Kollagen Typ IV für 2 h
Positivkontrolle		CCL19 $10^{-8}$ M
Fixierung / Färbung		Diff-Quik-Färbeset, Fixierung 30 sek in Methanol, Färbelösung I und II je 3 min
Chemotaxismedium		RPMI-FCS

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der optimierten Parameter für die Chemotaxis der drei Testzellpopulationen in der 48-Loch-Kammer (modifiziert nach BOYDEN<sup>38</sup>)

Alle Parameter außer Kultivierung / Stimulation waren nach Optimierung für alle drei Zellpopulationen einheitlich.

## 3.2 HPLC-Auftrennung von Extrakten und Überständen und ihre chemotaktische Aktivität

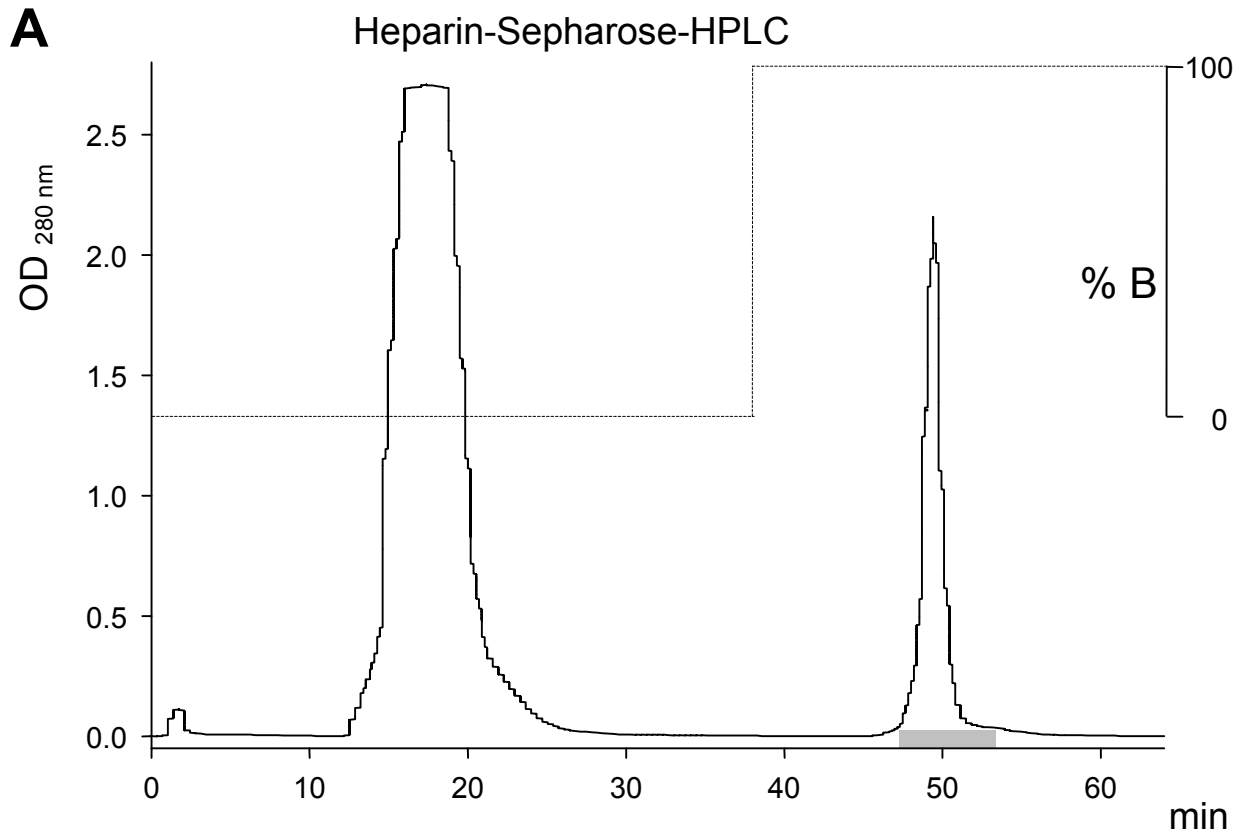
Nach Optimierung des Chemotaxisbioassays mit hoher Sensitivität und sehr guter Reproduzierbarkeit wurden die Überstände und Extrakte auf Lymphozyten-chemotaktische Substanzen hin untersucht. Im Einzelnen wurden vier Präparationen von Psoriasis-Hautschuppen und eine aus Fersenkallus angefertigt. Darüber hinaus wurden Überstände von

zwei primären Keratinozytenkulturen, der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, vier verschiedenen Kulturen primärer Fibroblasten, drei Kulturen dendritischer Zellen sowie der Bronchialepithel-Zelllinie A549 untersucht (siehe **Tabelle 3**). Die in dieser Arbeit verwendeten Kombinationen von HPLC-Säulen (z. B. Heparin-Sepharose Hi Trap, SP 250/10 Nucleosil C8, Mikropore MonoS PC 1.6/5, C4 „Wide-Pore“ Butyl 5 micron, TSK G2000SW 7,5 x 600 mm, Mikropore  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10) hatte sich zur Isolierung von Chemokinen bereits bewährt (siehe SCHRÖDER<sup>39</sup>). Dennoch wurden in keinem der hier untersuchten biologischen Materialien Peptide mit Lymphozyten-chemotaktischer Aktivität in für die weitere Analyse ausreichender Menge gefunden.

Die *Abbildung 7 A-D* zeigt eine exemplarische HPLC-Auftrennung, in der eine anfangs gut erkennbare chemotaktische Aktivität für HuT78-Zellen aus Überständen dendritischer Zellen während der HPLC-Reinigung schwächer wurde und schließlich nicht mehr meßbar war. Eine solche Reduktion der in den Fraktionen enthaltenen Menge eines gesuchten Proteins während der Aufreinigung in der HPLC ist unvermeidbar. SCHRÖDER<sup>39</sup> zeigte eine Abnahme der Menge von enthaltenem IL-8 während der Reinigung über fünf verschiedene Säulen auf 2,3 % des im Ausgangsmaterial enthaltenen IL-8.

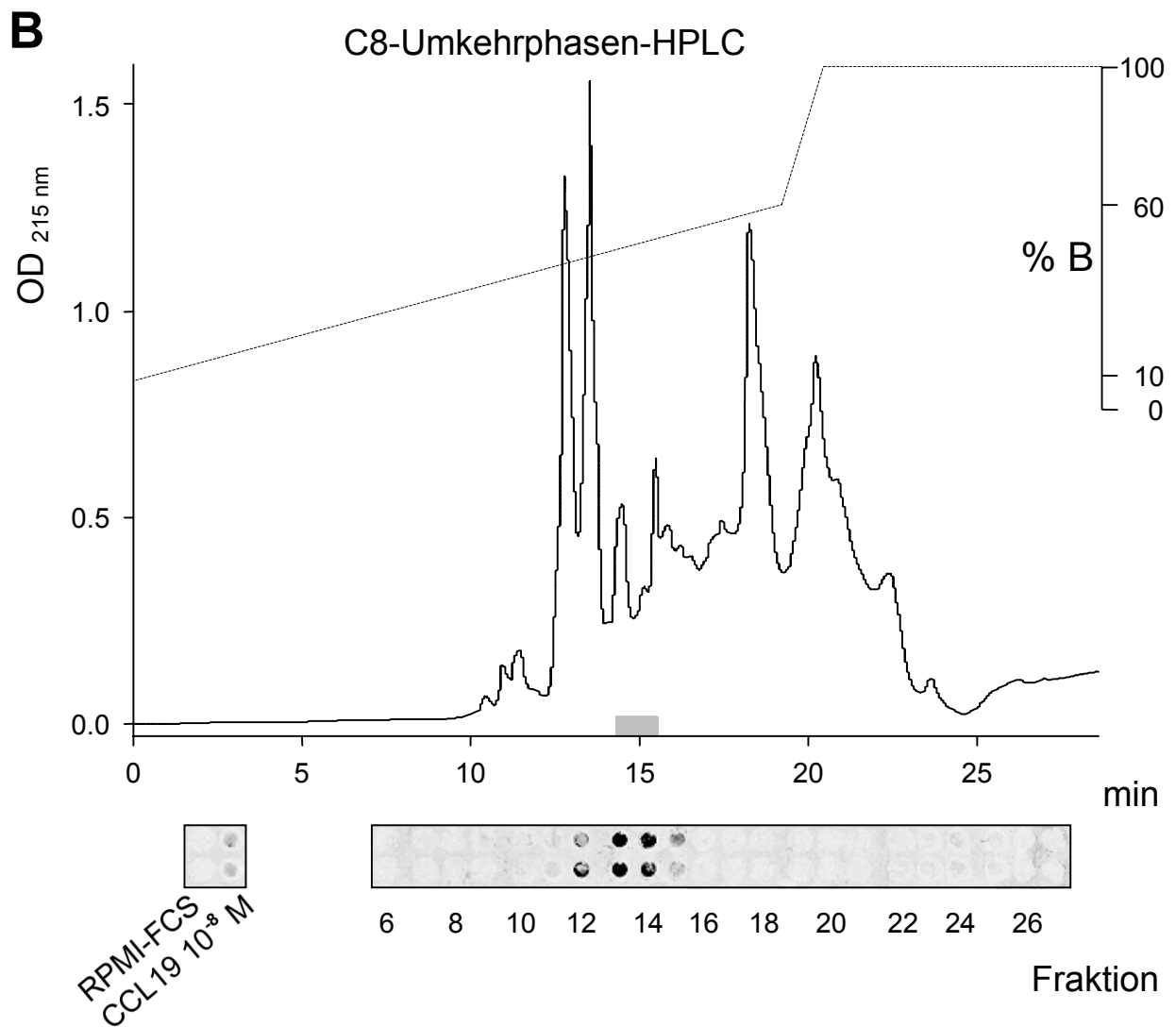


**Abbildung 7 A - D:** Aufeinander folgende HPLC-Trennungen von Überständen dendritischer Zellen und (B - D) HuT78-Chemotaxismessungen dieser HPLC-Fractionen



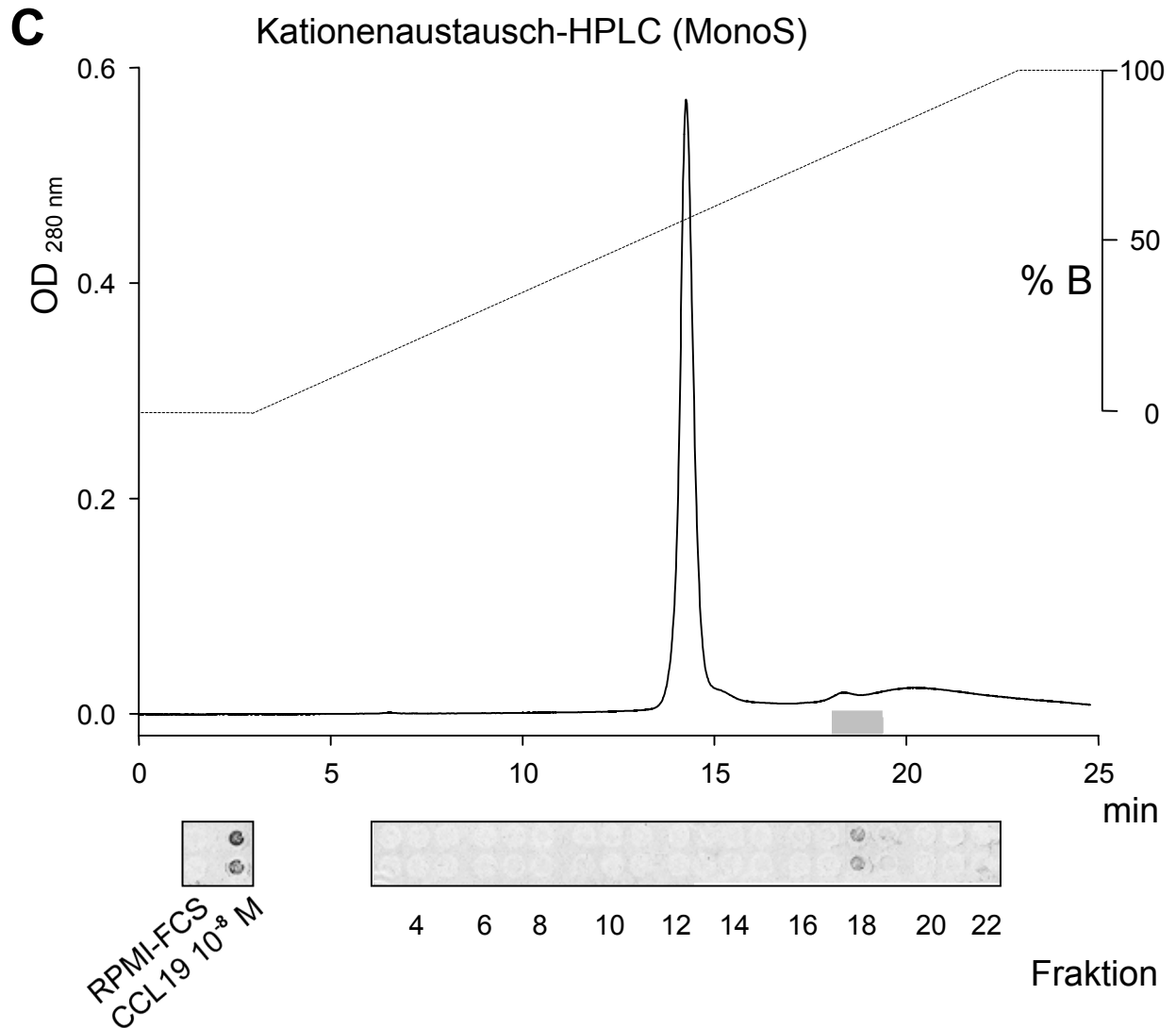
**Abbildung 7 A** zeigt den Verlauf der optischen Dichte einer Auftrennung von Präparation P aus Überständen dendritischer Zellen über eine Heparin-Säule bei 280 nm Wellenlänge.

Die gestrichelte Linie gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B (2 M NaCl) in Prozent wieder. Die graue Fläche unter dem zweiten Kurvenmaximum bezeichnet den Bereich der Heparin-bindenden Fraktion.



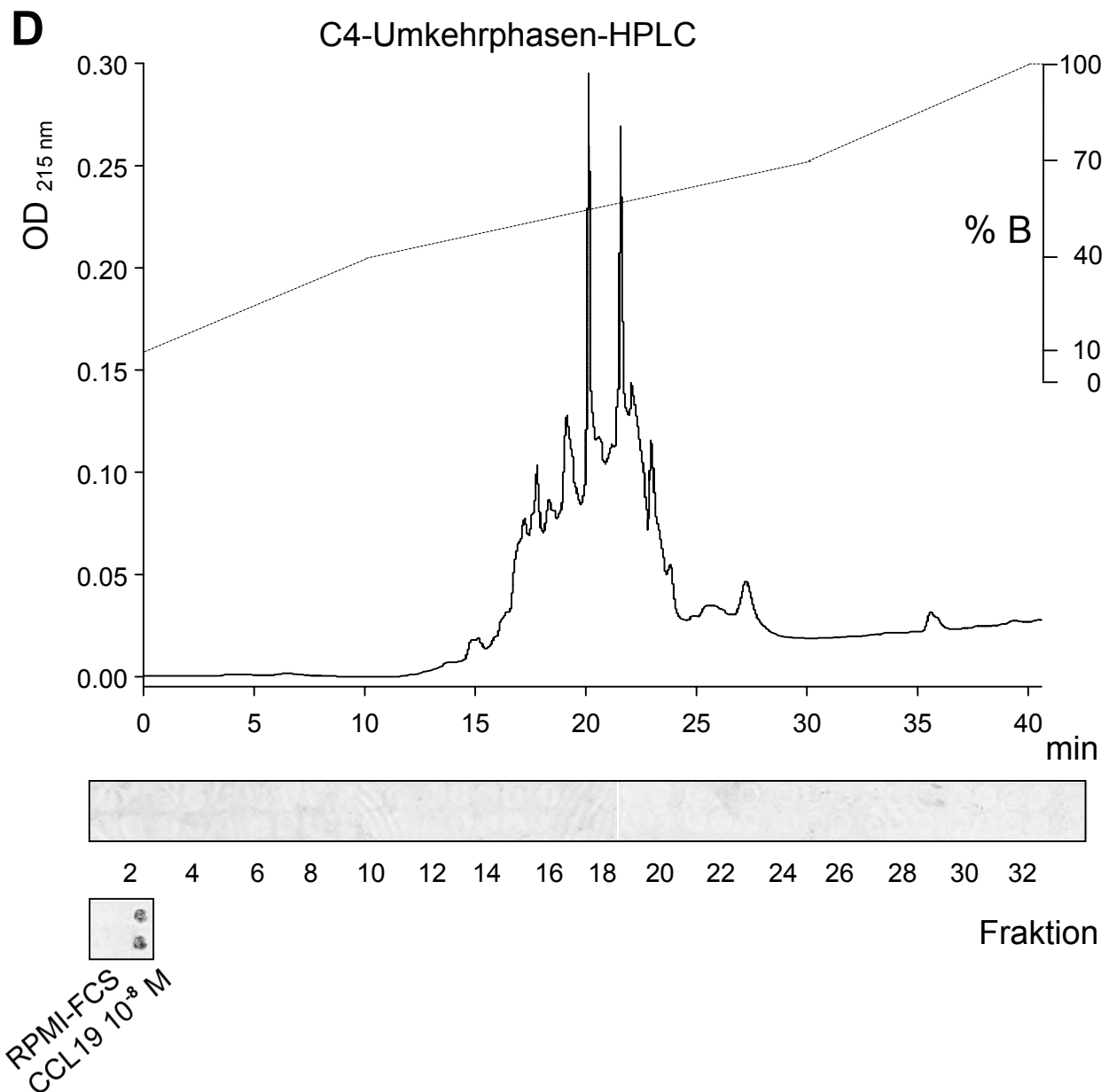
**Abbildung 7 B** zeigt die C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils aus **6 A** sowie darunter die Chemotaxisergebnisse der daraus hervorgegangenen HPLC-Fractionen 6 bis 27 mit HuT78-Zellen.

Als Positivkontrolle in der Chemotaxismessung wurde CCL19 10<sup>-8</sup> M eingesetzt, als Negativkontrolle RPMI-FCS. Die gestrichelte Linie in der Graphik gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B während der HPLC-Auftrennung wieder (10-100%). Der grau markierte Bereich unter der Kurve bezeichnet die Fraktionen 13 und 14, die chemotaktische Aktivität für HuT78-Zellen enthalten.



**Abbildung 7 C** zeigt eine Kationenaustausch-HPLC der Fraktion 14 aus **6 B** mit einer MonoS-Säule sowie darunter die Chemotaxisresultate der daraus hervorgegangenen HPLC-Fractionen 3 bis 22 mit HuT78-Zellen.

Als Positivkontrolle wurde CCL19 10<sup>-8</sup> M eingesetzt, als Negativkontrolle RPMI-FCS. Die gestrichelte Linie in der Graphik gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B während der HPLC-Auftrennung wieder. Der grau markierte Bereich unter der Kurve bezeichnet die Fraktionen 18 und 19, die für HuT78-Zellen mittlere bzw. sehr schwache chemotaktische Aktivität enthalten.



**Abbildung 7 D** zeigt eine C4-Umkehrphasen-HPLC der Fraktionen 18 und 19 aus **6 C** sowie darunter die Chemotaxisergebnisse der daraus hervorgegangenen HPLC-Fractionen 1 bis 34 mit HuT78-Zellen.

Als Positivkontrolle wurde CCL19 10<sup>-8</sup> M eingesetzt, als Negativkontrolle RPMI-FCS. Die gestrichelte Linie in der Graphik gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B während der HPLC-Trennung wieder (10-100%). Keine der Fraktionen enthielt meßbare chemotaktische Aktivität mit HuT78-Zellen.

### 3.2.1 Psoriasis-Hautschuppenextrakte

In Extrakten der Hautschuppen von Psoriasis-Patienten konnten anfänglich schwache und zum Teil nicht reproduzierbare chemotaktische Aktivitäten für HuT78-Zellen gefunden werden. Bei den nachfolgenden Reinigungsschritten in der HPLC sanken die gefundenen Aktivitäten unter die Nachweisgrenze. Mit IL-2-stimulierten PBL konnte keine reproduzierbare chemotaktische Aktivität gemessen werden. Auch mit OKT3-stimulierten PBL und Th1-angereicherten

Lymphozyten wurde keine chemotaktische Aktivität in Psoriasis-Extrakten festgestellt (*Tabelle 8*).

### **3.2.2 Kallus-Hornextrakt**

Aus Kallus-Gewebe, welches aus Hornmaterial von Fersen bestand, wurde ein Extrakt hergestellt. HuT78-Zellen zeigten geringe, nicht reproduzierbare chemotaktische Aktivität für Fraktionen dieses Kallus-Extraktes, die bei weiterer HPLC-Reinigung nicht mehr meßbar war. OKT3-stimulierte PBL zeigten keine chemotaktische Aktivität für Kallus-Extrakt (*Tabelle 9*).

### **3.2.3 Überstände von primären, humanen Keratinozyten und der Zelllinie HaCaT**

HuT78-Zellen zeigten gegenüber Fraktionen von Überständen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT nach Trennung in der C8-Umkehrphasen-HPLC zum Teil hohe chemotaktische Aktivität, die nach weiteren Reinigungsschritten unter die Nachweisgrenze sank. Mit Überständen primärer, humaner Keratinozyten zeigten sie keine chemotaktisch stimulierte Migration. IL-2-stimulierte PBL zeigten keine, OKT3-stimulierte PBL nicht reproduzierbare Aktivität für Überstände von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten (*Tabelle 10*).

### **3.2.4 Überstände primärer, humaner Fibroblasten**

HuT78-Zellen und IL-2-stimulierte PBL zeigten anfangs geringe chemotaktische Aktivitäten für einige Fraktionen von Überständen primärer, humaner Fibroblasten, die nach weiterer HPLC-Auftrennung nicht mehr nachweisbar waren. OKT3-stimulierte PBL zeigten keine reproduzierbare chemotaktische Aktivität mit Fibroblasten-Kulturüberständen (*Tabelle 11*).

### **3.2.5 Überstände dendritischer Zellen**

Auf Fraktionen von Überständen dendritischer Zellen reagierten HuT78-Zellen zum Teil chemotaktisch sehr aktiv und IL-2- bzw. PHA-stimulierte PBL leicht und zum Teil nicht reproduzierbar. In allen Fällen sank die chemotaktische Aktivität unter die Nachweisgrenze, bevor eine einzelne Substanz mit Hilfe von HPLC isoliert werden konnte. OKT3-stimulierte PBL zeigten keine reproduzierbare chemotaktisch stimulierte Migration mit Überständen dendritischer Zellen (*Tabelle 12* und *Abbildung 7 A-D*).

### **3.2.6 Überstände der Bronchialepithel-Zelllinie A549**

HuT78-Zellen zeigten geringe chemotaktische Aktivität mit Fraktionen von Überständen der Bronchialepithel-Zelllinie A549, die nach der folgenden HPLC-Reinigung nicht mehr meßbar war. IL-2-stimulierte PBL zeigten nicht reproduzierbare, OKT3-stimulierte PBL keine Aktivität mit diesen Überständen (*Tabelle 13*).

Übersichten aller HPLC-Fraktionen mit gegebenenfalls darin enthaltenen chemotaktischen Aktivitäten sind in *Tabelle 8* bis *Tabelle 13* nach Herkunft der Präparationen sortiert dargestellt.

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion
<b>HuT78</b>	A	01	RP8	7(+) 8+	20	MonoS	∅
	B	04	RP8	12(+) 14+ 18(+)	21	MonoS	∅
	C	05	RP8	∅			
	D	07	RP8	∅			
<b>PBL, IL-2</b>	A	02	RP8	17(+) 29(+) 36(+)			
		03	RP8	4(+)			
	C	05	RP8	∅			
<b>PBL, OKT3</b>	A	01	RP8	∅	20	MonoS	∅
	B	04	RP8	∅	21	MonoS	∅
	C	05	RP8	∅			
	D	07	RP8	∅			
<b>Th1-Zellen</b>	A	01	RP8	∅			
	B	04	RP8	∅			
	C	05	RP8	∅			
		06	RP8	∅			
	D	07	RP8	∅			

**Tabelle 8:** Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Psoriasis-Schuppenextrakten

**A, B** und **C** bezeichnen Präparationen von Psoriasis-Schuppen ohne, **D** mit vorheriger Lipidextraktion. **B** stammt aus Hautschuppen nur eines Patienten, die anderen sind Gemische von Schuppen mehrerer Patienten.

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion
<b>HuT78</b>	E	08	RP8	5(+) 6(+) 7(+)
<b>PBL, OKT3</b>	E	08	RP8	∅

**Tabelle 9:** Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Kallusextrakt

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion
HuT78	J	13	RP8	∅						
	K	14	RP8	∅						
	L	15	RP8	10(+)	23	MonoS	15(+)			
				11++			12(+)			
			14++	25	MonoS	11+	36	RP4	∅	
PBL, IL-2	L	15	RP8	∅						
PBL, OKT3	K	14	RP8	3(+)						
				4(+)						
	L	15	RP8		24	MonoS	∅	36	RP4	∅
				25	MonoS					
				15(+)						

**Tabelle 10:** Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Überständen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und von primären, humanen Keratinozyten

**J:** Präparation aus Überständen primärer, humaner Keratinozyten, die für 48 h mit Latexextrakt stimuliert wurden

**K:** Präparation aus Überständen primärer, humaner Keratinozyten, für 48 h mit Milbenextrakt stimuliert

**L:** Präparation aus Überständen der Zelllinie HaCaT, die für 48 h mit TNF $\alpha$  stimuliert wurden

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv; ++ stark positiv

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion			
<b>HuT78</b>	F	09	RP8	5+ } 6+ } 7+ } 8(+) 9(+)	22	MonoS	∅			
				G				10	RP8	∅
				H				11	RP8	2(+)
				I				12	RP8	∅
<b>PBL, IL-2</b>	F	09	RP8	5+ } 6+ } 7+ } 13(+)	22	MonoS	∅			
<b>PBL, OKT3</b>	F	09	RP8	∅	22	MonoS	12(+) 13(+)			
				G			10	RP8	∅	
				H			11	RP8	∅	
				I			12	RP8	∅	

**Tabelle 11:** Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Überständen primärer, humaner Fibroblasten

**F:** Präparation der Überstände primärer, humaner Fibroblasten, nach der 7. Passage für 48 h mit  $TNF\alpha$  stimuliert

**G:** Präparation von Überständen der Fibroblasten eines Psoriasis-Patienten nach  $TNF\alpha$ -Stimulation der Zellen in Kultur für 48 h

**H:** Präparation von Überständen der unstimulierten Fibroblasten eines Psoriasis-Patienten

**I:** Präparation von Überständen der unstimulierten Fibroblasten eines Neurodermitis-Patienten

Die mit geschweiften Klammern versehenen Fraktionen wurden vor der jeweils nächsten Trennung zusammengegeben.

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv





Fortsetzung von Tabelle 12

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion
PBL, IL-2 oder PHA	N	17	RP8	13+ 26+ } 27+ }	27	MonoS	∅	42	TSK2t	20(+) 21(+) 28(+)	43	C2/18	∅
	P	19	RP8	12+	33	MonoS	∅						
PBL, OKT3	N	17	RP8	16(+)	27	MonoS	∅	42	TSK2t		43	C2/18	∅
					30	MonoS							
	O	18	RP8	∅									
	P	19	RP8	∅	33	MonoS	∅	41	RP4	∅			
34					MonoS	∅							
35					MonoS								

**N:** Präparation von Überständen dendritischer Zellen nach Kultur in RPMI mit 1,5% autologem Plasma für 3-4 Tage

**O:** Präparation von Überständen dendritischer Zellen nach Kultur mit FCS und Plasma für 5-7 Tage

**P:** Präparation von Überständen dendritischer Zellen nach Kultur mit 10% FCS für 5-7 Tage

Die Chromatogramme der grau unterlegten HPLC-Läufe (HuT78; Präparation P, Läufe 19, 35 und 41) sind in *Abbildung 7* gezeigt. Die mit geschweiften Klammern versehenen Fraktionen wurden vor der jeweils nächsten Trennung zusammengegeben. Die beiden mit „Gerätefehler“ bezeichneten Fraktionen waren beim nachfolgenden HPLC-Reinigungsschritt durch einen Fehler an der Pumpe verloren gegangen.

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv; ++ stark positiv

Testzellen	Präparation	Lauf	Säule	Positive Fraktion	Lauf	Säule	Positive Fraktion
HuT78	M	16	RP8	22(+) 25+	26	MonoS	∅
PBL, IL-2	M	16	RP8	16(+)			
PBL, OKT3	M	16	RP8	∅			

**Tabelle 13:** Chemotaktische Aktivität in HPLC-gereinigten Überständen der Bronchialepithel-Zelllinie A549

∅ keine positive Fraktion; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv

### 3.3 Immunreaktivität für Lymphozyten-chemotaktische Chemokine in HPLC-Fractionen von Psoriasis-Schuppenextrakten

Die Immunreaktivität in HPLC-gereinigten Fraktionen von Psoriasis-Schuppenextrakten mit Antikörpern gegen verschiedene bereits bekannte Chemokine wurde in Festphasen-ELISA und „Dot Blot“-Analysen gemessen.

#### 3.3.1 Immunreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakt für anti-CCL19-Antikörper im Festphasen-ELISA

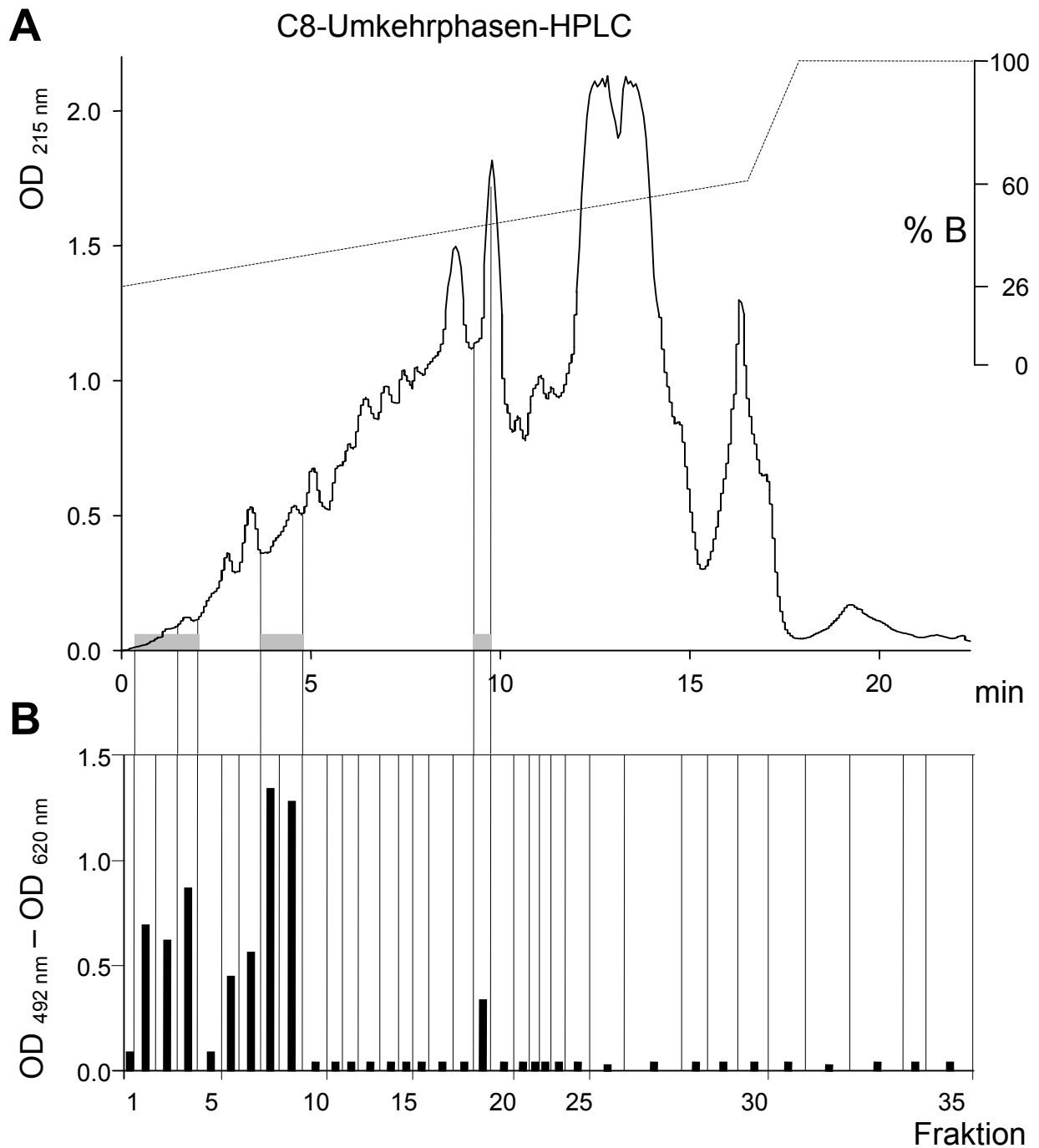
In einigen Fraktionen einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Anteils von Psoriasis-Schuppenextrakt wurde Immunreaktivität mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen das Chemokin CCL19 festgestellt (*Abbildung 8*). Die schwächeren Aktivitäten in den Fraktionen 2 bis 4 und 19 konnten nach weiteren HPLC-Reinigungsschritten im ELISA nicht mehr gemessen werden. Die beiden Fraktionen mit der höchsten Aktivität (Nr. 8 und 9) wurden vereinigt und in einer Kationenaustausch-HPLC über eine MonoS-Säule getrennt. Hier trat eine noch stärkere Immunreaktivität mit anti-CCL19 auf (*Abbildung 9*). Die Fraktion mit dem stärksten Signal (Nr. 19) wurde in einer C2/C18-Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Hier trat Aktivität für anti-CCL19 in den Fraktionen 16 bis 19 mit zwei Maxima bei den Fraktionen 16 und 18 auf (*Abbildung 10 A und B*).

Eine SDS-PAGE der Fraktionen 14 bis 21 im Vergleich mit rekombinant-humanem CCL19 zeigte eine Bande im Bereich von ca. 27 kDa in den Fraktionen 15 bis 19 mit der größten Intensität in Fraktion 18. CCL19 zeigte eine Bande im Bereich des 8,6 kDa-Größenstandards, was recht genau der erwarteten Größe von CCL19, 8,8 kDa, entsprach (*Abbildung 11*).

Ein „Western Blot“ der Fraktionen 15 bis 20 und 90 ng rekombinant-humanem CCL19 zeigte eine deutliche Färbung für das rekombinante Peptid, aber keine für die HPLC-Fractionen (*Abbildung 12*). Aufgrund dieser Daten wurde bei dem ELISA aus *Abbildung 10 B* von einer nicht Antigen-spezifischen Bindung des anti-CCL19-Antikörpers an eine in der SDS-PAGE bei

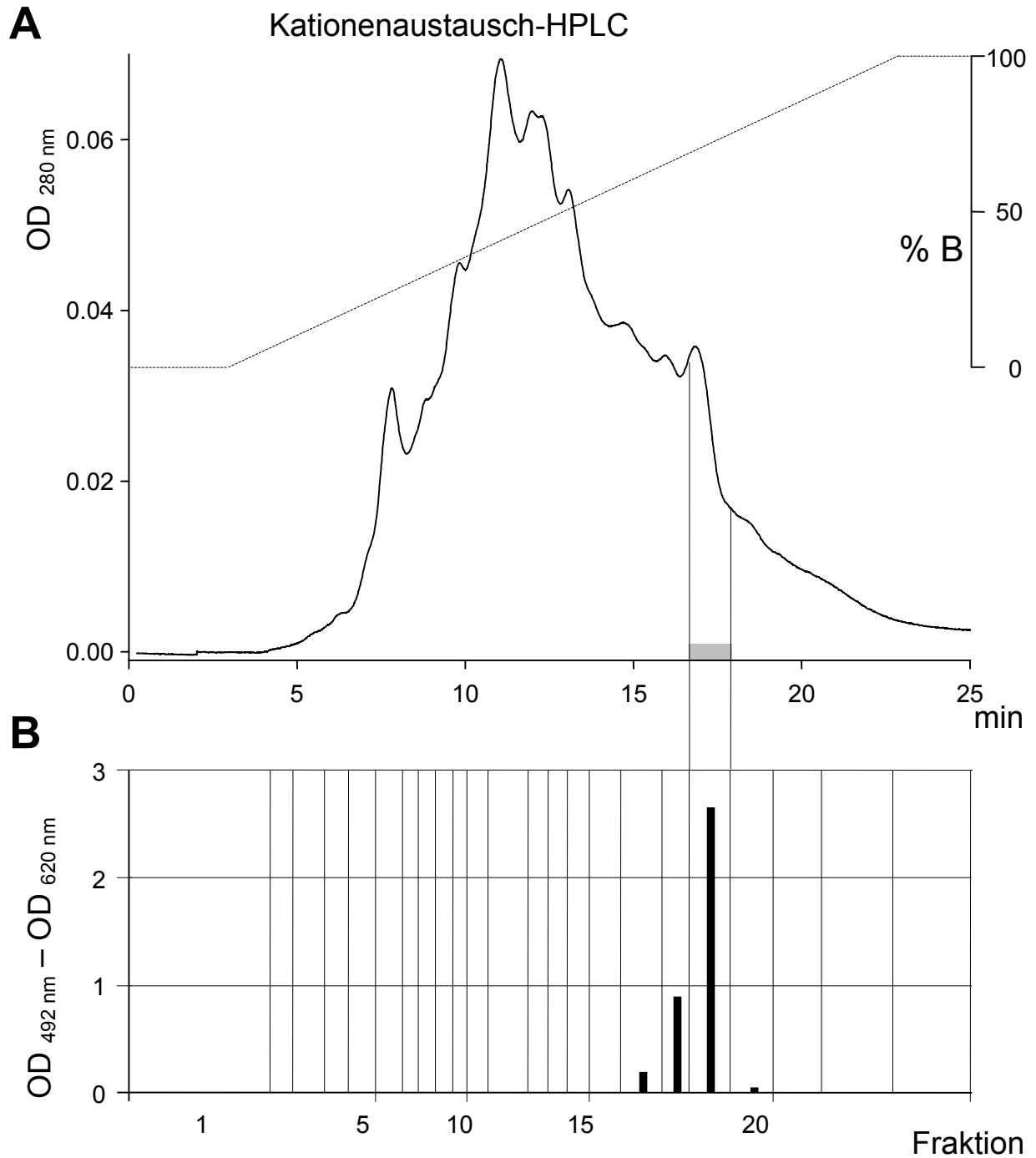
---

27 kDa liegende Substanz ausgegangen. Um diese Vermutung zu stützen, wurde mit den Fraktionen 14-21 des letzten HPLC-Schrittes, der C2/C18-Umkehrphasen-Trennung, ein Festphasen-ELISA mit Kaninchen-Normalserum an Stelle des anti-CCL19-Antikörpers durchgeführt. Auch hier konnte eine Immunoreaktivität gemessen werden, die im Muster mit Maxima bei Fraktion 16 und 18 dem ELISA mit Kaninchen-anti-CCL19 entsprach (*Abbildung 10 C*, vgl. mit *B*).



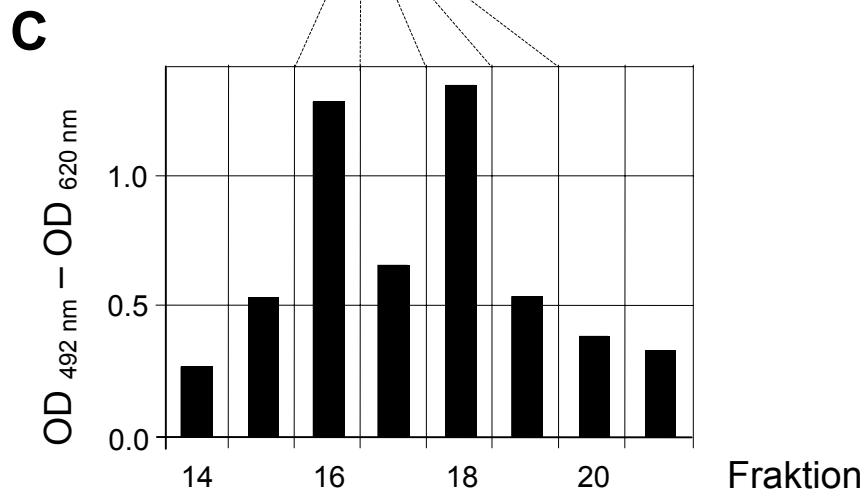
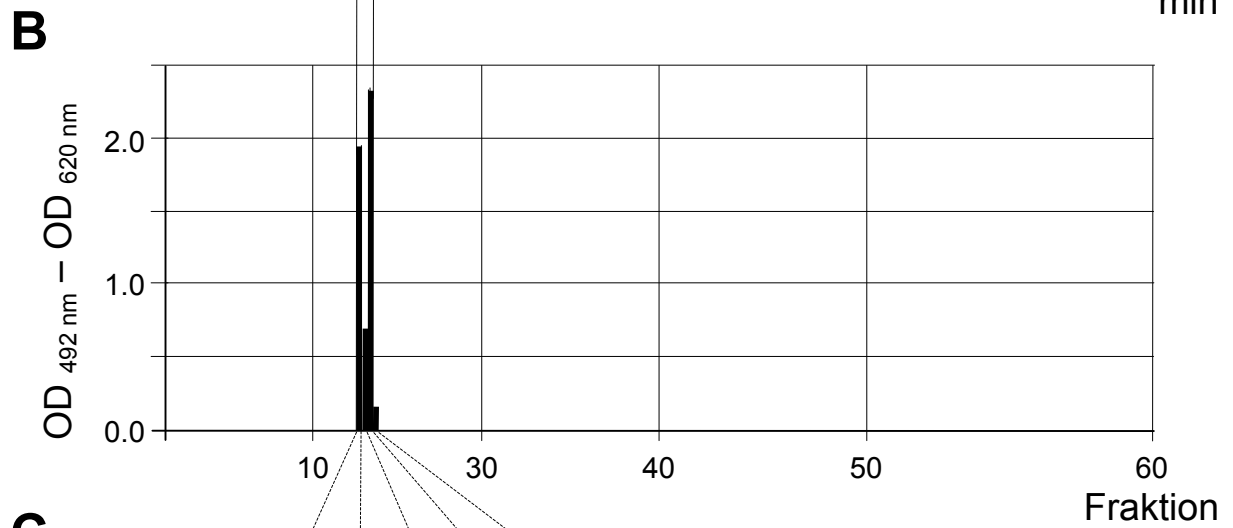
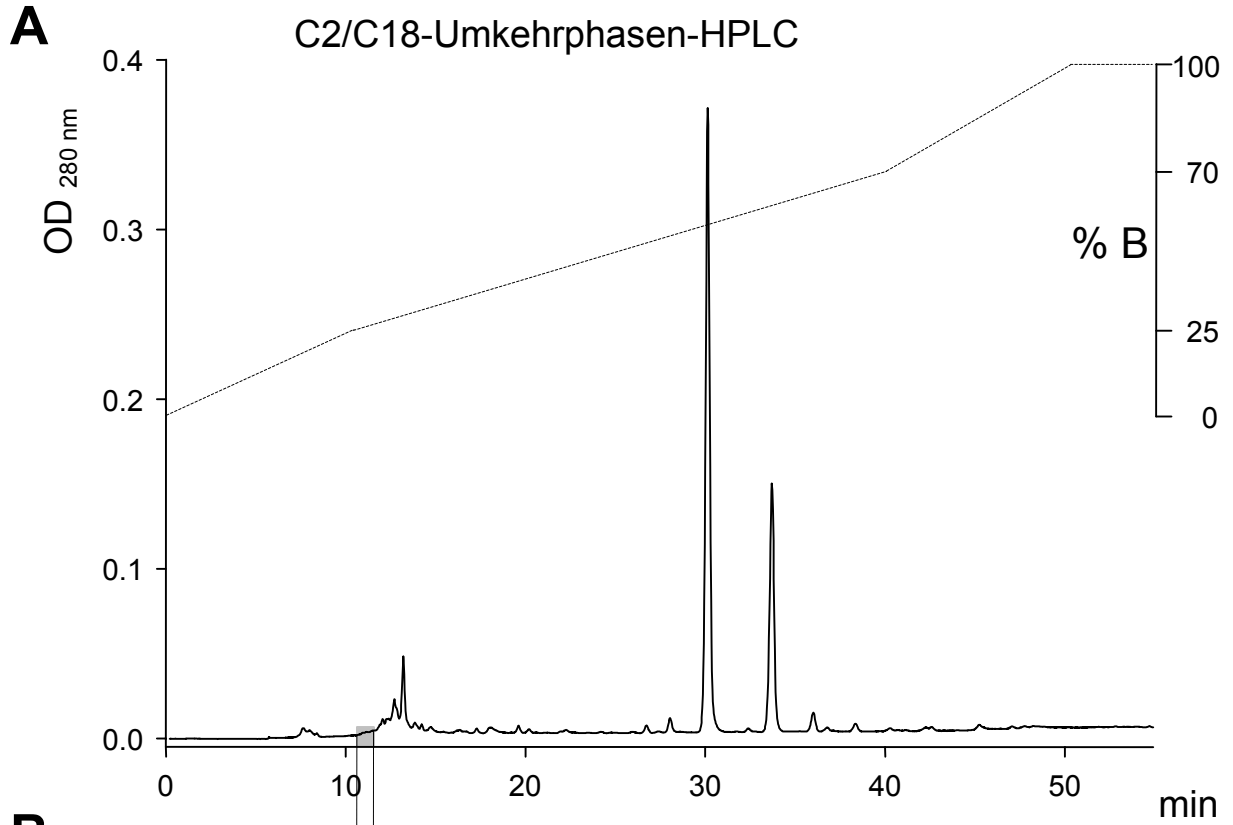
**Abbildung 8:** C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der daraus hervorgegangenen Fraktionen.

**A** zeigt den Verlauf der optischen Dichte einer C8-Umkehrphasen-HPLC von Psoriasis-Schuppenextrakt bei 215 nm (Lauf 05 aus Präparation C, ohne Lipidextraktion). Die gestrichelte Linie gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B (im abgebildeten Bereich von 26 bis 100%) wieder. In **B** ist ein Festphasen-ELISA der aus Lauf 05 hervorgegangenen HPLC-Fractionen mit Antikörpern gegen rekombinant-humanes CCL19 dargestellt. Die grauen Flächen unter der Kurve in **A** zeigen den Bereich von im ELISA positiven Fraktionen.



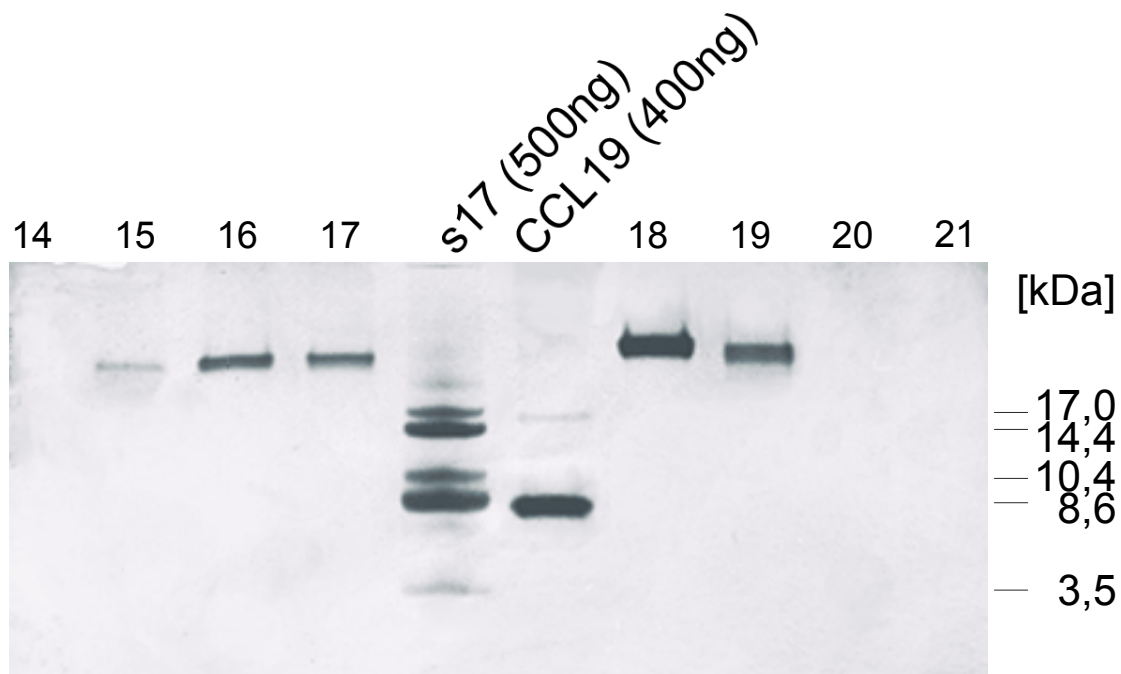
**Abbildung 9:** Kationenaustausch-HPLC der Fraktionen 8 und 9 aus Lauf 05 und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der entstandenen Fraktionen.

**A** zeigt den Verlauf der optischen Dichte einer Kationenaustausch-HPLC der Fraktionen 8 und 9 einer vorausgegangenen C8-Umkehrphasen-HPLC (*Abbildung 8*) bei 280 nm. Die gestrichelte Linie gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B wieder. In **B** ist ein Festphasen-ELISA der aus der o. a. Kationenaustausch-HPLC hervorgegangenen HPLC-Fraktionen mit Antikörpern gegen CCL19 dargestellt. Die graue Fläche unter der Kurve in **A** zeigt den Bereich der im ELISA am stärksten positiven Fraktion.



**Abbildung 10** (vorherige Seite): C2/C18-Umkehrphasen-HPLC von Fraktion 19 aus der vorausgegangenen Kationenaustausch-HPLC und anti-CCL19-Festphasen-ELISA der entstandenen Fraktionen sowie Kaninchen-Normalserum-Festphasen-ELISA der Fraktionen 14 bis 21 aus diesem Lauf.

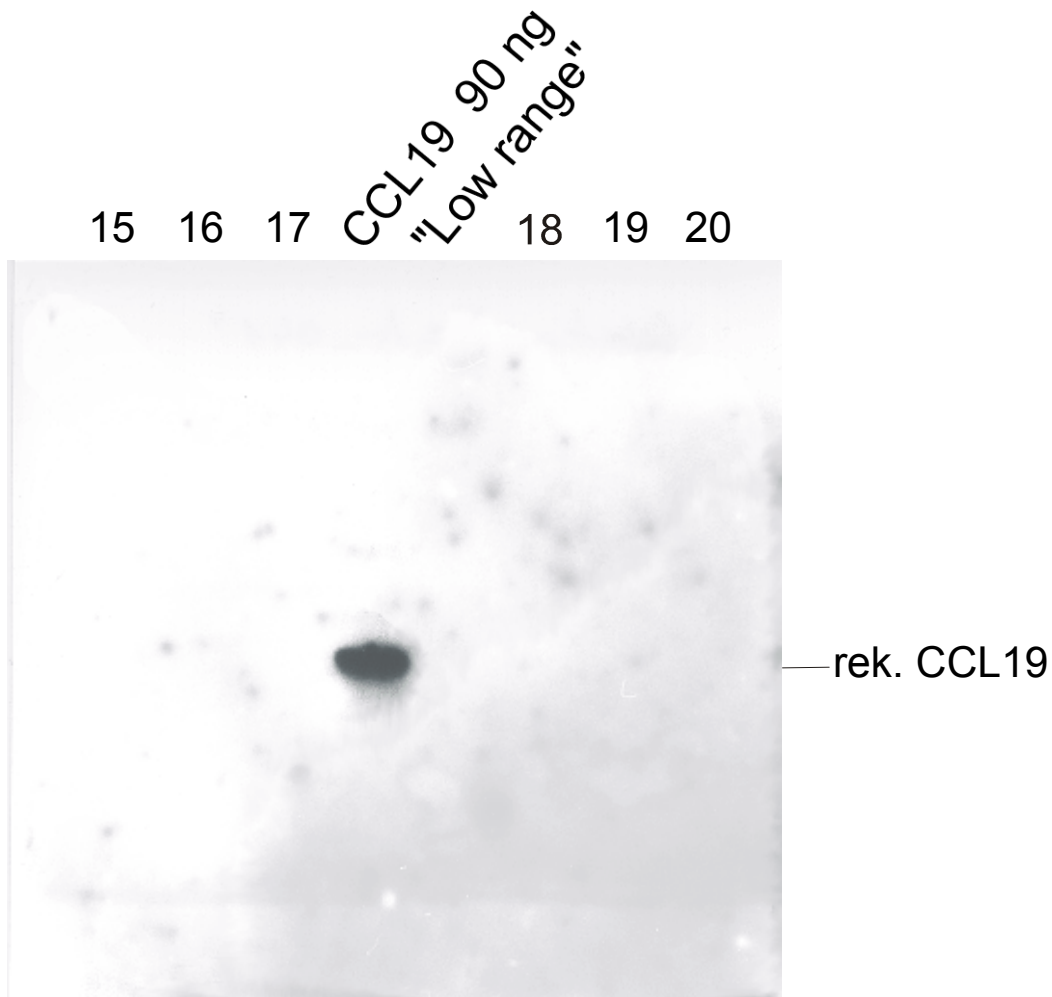
**A** zeigt den Verlauf der optischen Dichte einer C2/C18-Umkehrphasen-HPLC von Fraktion 19 der vorausgegangenen Kationenaustausch-HPLC (*Abbildung 9*) bei 280 nm. Die gestrichelte Linie gibt den Konzentrationsverlauf von Laufmittel B wieder. In **B** ist ein Festphasen-ELISA der aus dieser Trennung hervorgegangenen HPLC-Fraktionen mit Antikörpern gegen CCL19 dargestellt. Die graue Fläche unter der Kurve in **A** zeigt den Bereich der im ELISA positiven Fraktionen. **C** zeigt die Ergebnisse eines Festphasen-ELISA der Fraktionen 14 bis 21 aus dieser Trennung mit Kaninchen-Normalserum anstelle eines primären Antikörpers. Es ergibt sich ein ähnlicher Aktivitätsverlauf wie in dem ELISA mit CCL19-spezifischem Kaninchen-Antikörper (**B**).



**Abbildung 11:** SDS-PAGE der Fraktionen 14 bis 21 der o. a. C2/C18-HPLC (Chromatogramm *Abbildung 10*) im Vergleich mit rekombinant-humanem CCL19.

In Bahn 5 wurden 500 ng eines s17-Größenstandards aufgetragen. Die Größe der Banden ist rechts in Kilodalton angegeben. In Bahn 6 wurden 400 ng rekombinant-humanes CCL19 aufgetragen. Die prominente Bande lag bei ca. 8,6 kDa (CCL19: 8,8 kDa). In den Fraktionen 15 bis 19, von denen je 5  $\mu$ l aufgetragen wurden, war jeweils eine Bande bei ca. 27 kDa zu sehen, am stärksten in Fraktion 18. Im Größenbereich des rekombinanten CCL19 zeigte keine der Fraktionen eine Färbung.





**Abbildung 12:** Chemilumineszenz des „Western Blots“ einer PHAST-SDS-PAGE der Fraktionen 15 bis 20 der o. a. C2/C18-HPLC mit Antikörpern gegen CCL19.

In Bahn 5 war blau vorgefärbter „Low range“-Größenstandard aufgetragen worden, der keine Chemilumineszenz zeigte. In Bahn 4 waren 90 ng rekombinant-humanes CCL19 aufgetragen worden. Der Vergleich mit dem Größenstandard auf dem Original-„Blot“ zeigte, daß die Bande in Bahn 4 auf einer Höhe von ca. 9 kDa lag (CCL19: 8,8 kDa). Von den Fraktionen wurden je 1 µl aufgetragen. In keiner der Fraktionen 15 bis 20 war Chemilumineszenz sichtbar.

### 3.3.2 Immunoreaktivität von Psoriasis-Schuppenextrakt für Antikörper gegen verschiedene Chemokine in der „Dot Blot“-Analyse

„Dot Blot“-Analysen einer C8-Umkehrphasen-HPLC-Trennung von Psoriasis-Schuppenextrakt wurden mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen CCL19, CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$ , CCL17, CXCL11, CXCL9 (HuMig), CCL20, CCL18 (MIP-4), CCL21 (SLC), CCL25 (TECK), CX<sub>3</sub>CL1 (Fractalkin) und XCL1 (Lymphotactin) durchgeführt. Bei Verwendung der „Pure Nitrocellulose“-Membran von BioRad konnten für Antikörper gegen CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$  und CCL17 positive Fraktionen gefunden werden. Die Färbungen waren jedoch meist sehr schwach, schlecht reproduzierbar und insbesondere die Positivkontrollen mit dem jeweiligen rekombinanten Peptid waren nicht eindeutig positiv. Mit Antikörpern gegen CX<sub>3</sub>CL1 wurde in

keiner Fraktion Immunreaktivität gefunden. Den stärksten Unterschied in den Färbungen von Positiv- und Negativkontrolle mit dieser Membran zeigte ein „Dot Blot“ mit Antikörpern gegen CCL17 (*Abbildung 13*). Eine Zusammenfassung der „Dot Blot“-Ergebnisse mit dieser Membran ist in *Tabelle 14* dargestellt.

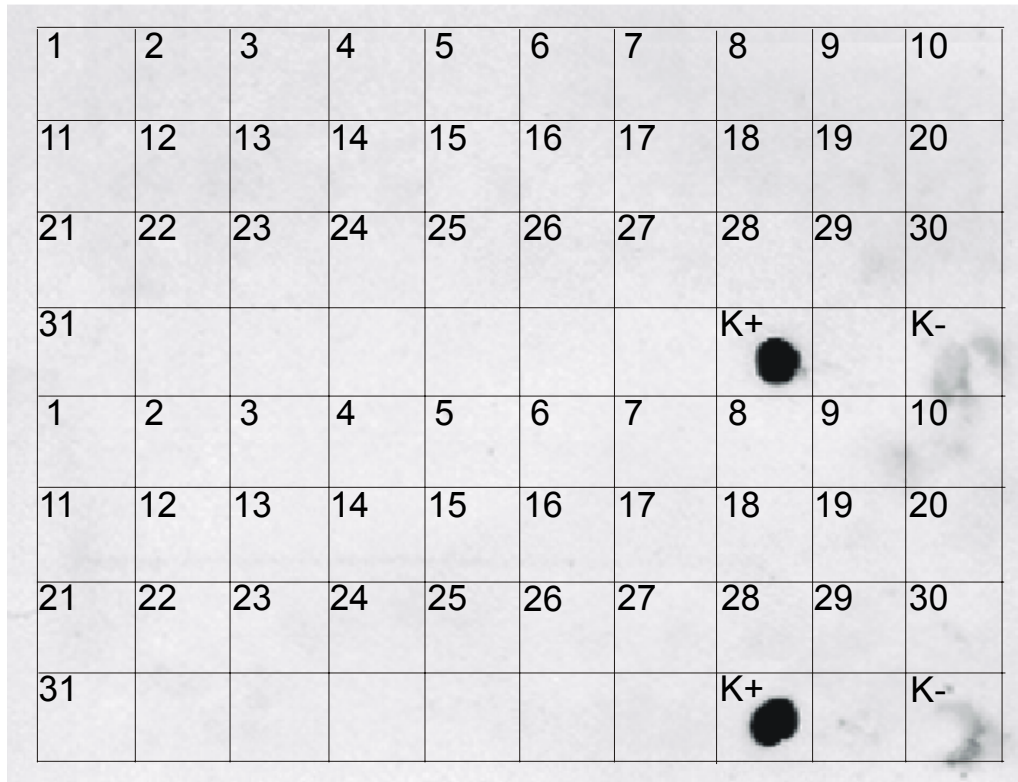
Für eine sehr viel bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde später die ImmobilonP-Membran von Millipore verwandt. Hier wurden deutliche Aktivitäten für die Positivkontrollen mit den rekombinant-humanen Chemokinen CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL11, CXCL9, CCL20, CCL18, CCL21, CCL25, CX<sub>3</sub>CL1 und XCL1 (jeweils ca. 50 ng) gemessen. In keiner Fraktion der C8-Umkehrphasen-HPLC von Psoriasis-Schuppenextrakt (Lauf 06) wurde mit dieser Membran Aktivität gemessen. Als Beispiel für die Ergebnisse mit dieser Membran ist ein „Dot Blot“ mit Antikörpern gegen CXCL12 $\alpha$  in *Abbildung 14* dargestellt. Die rekombinanten Peptide CCL19, CXCL12 $\beta$  und CCL17 zeigten mit dieser Membran keine im „Dot Blot“ meßbaren Aktivitäten (*Tabelle 15*).



**Abbildung 13:** „Dot Blot“-Analyse aller Fraktionen einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt mit polyklonalen Antikörpern gegen CCL17 und einer BioRad-„Pure Nitrocellulose“-Membran.

K+ ist die Positivkontrolle mit 50 ng rekombinant-humanem CCL17.

K- ist die Negativkontrolle mit 6  $\mu$ l RPMI-FCS. Die HPLC-Fraktionen (je 1  $\mu$ l unverdünnt aus Lauf 06, Präparation C) sind mit Zahlen von 1 bis 31 bezeichnet. Alle Fraktionen sowie die Kontrollen wurden an je zwei Positionen aufgetragen.



**Abbildung 14:** „Dot Blot“-Analyse von Fraktionen einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Teils von Psoriasis-Schuppenextrakt mit polyklonalen Antikörpern gegen CXCL12 $\alpha$  und einer ImmobilonP-Membran.

K+ ist die Positivkontrolle mit 50 ng rekombinant-humanem CXCL12 $\alpha$ .

K- ist die Negativkontrolle mit 6  $\mu$ l RPMI-FCS. Die HPLC-Fraktionen (je 1  $\mu$ l unverdünnt aus Lauf 06, Präparation C) sind mit Zahlen von 1 bis 31 bezeichnet.

Antikörper	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	K <sup>+</sup>							
CCL2															+	+																		+	+	+	(+)		
CXCL12 $\alpha$													+	+	+	+										+												-	
CXCL12 $\beta$																											+	+											-
CCL17																+	+	++	+																				(+)
CX <sub>3</sub> CL1																																							-

**Tabelle 14:** Übersicht über alle „Dot Blot“-Ergebnisse mit der „Pure Nitrocellulose“-Membran von BioRad:

Die Fraktionen 1-31 stammten aus einer C8-Umkehrphasen-HPLC des Heparin-bindenden Anteils von Psoriasis-Hautschuppenextrakt (Lauf 06). Als Positivkontrolle (K<sup>+</sup>) wurden 50 ng des jeweils dem Antikörper entsprechenden Chemokins aufgetragen. Die „Pure Nitrocellulose“-Membran von BioRad brachte unklare, nicht reproduzierbare Ergebnisse.

- nicht positiv; (+) nicht reproduzierbar positiv; + positiv; ++ stark positiv

**Tabelle 15:** Übersicht über alle „Dot Blot“-Ergebnisse mit der ImmobilonP-Membran von Millipore:

Bei Verwendung dieser Membran wurden gute Ergebnisse mit deutlicher Immunoreaktivität für die untersuchten rekombinanten Chemokine (außer CCL19, CXCL12 $\beta$  und CCL17) erzielt (K<sup>+</sup>). Mit dieser Membran zeigte keine der HPLC-Fraktionen für die getesteten Antikörper Immunoreaktivität.

- nicht positiv; + positiv;

++ stark positiv

Antikörper	K <sup>+</sup>
CCL19	-
CCL2	++
CXCL12 $\alpha$	++
CXCL12 $\beta$	-
CCL17	-
CXCL11	++
CXCL9	++
CCL20	++
CCL18	+
CCL21	+
CCL25	++
CX <sub>3</sub> CL1	++
XCL1	++

## 4 Diskussion

Im folgenden wird dargestellt, warum dieser methodische Ansatz gewählt wurde (*Kapitel 4.1*). Die Aussagekraft und Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse aus chemotaktischen (*Kapitel 4.2*) und immunochemischen Experimenten (*Kapitel 4.3*) wird diskutiert und mit der Literatur abgeglichen. Ein Ausblick in *Kapitel 4.4* stellt dar, welche Art von Untersuchungen nach Auffassung des Autors sinnvoll wären, um die Erkenntnisse dieser Arbeit weiter zu vertiefen.

### 4.1 Optimierung der Methodik

#### 4.1.1 Messung der chemotaktischen Aktivität von Leukozyten

Die Fähigkeit zur chemotaktischen Migration ist eine Eigenschaft vieler Leukozyten und insbesondere auch der mononukleären Entzündungszellen.

Allgemein bezeichnet Chemotaxis „die durch einen Gradienten einer diffusionsfähigen Substanz gelenkte Bewegung einer Zelle“<sup>40</sup>. In der vorliegenden Arbeit ist mit Chemotaxis die stimulierte Migration von Leukozyten in Richtung einer höheren Lockstoff- (Chemotaxin-) Konzentration gemeint. Hiervon abzugrenzen ist die ebenfalls stimulierte, aber ungerichtete Zellwanderung, die Chemokinese. Die Bewegung von Zellen ohne äußeren Stimulus wird als zufällige Migration bezeichnet<sup>41</sup>.

Damit Zellen sich bewegen können, benötigen sie ein intaktes Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystem<sup>42</sup>. Für ihre chemotaktische Aktivität ist außerdem notwendig, daß die Zellen das Chemotaxin und seinen Konzentrationsgradienten erkennen<sup>43</sup>.

In einem komplexen Immunsystem wie dem des Menschen spielt die Fähigkeit der Immunzellen zur chemotaktischen Migration eine sehr wichtige Rolle, z. B. für die Rekrutierung von Entzündungszellen an den Ort immunologischer Reaktionen (Wunden, Entzündungsherde, Tumoren). Daher wurden verschiedene *in vitro* -Methoden entwickelt, um Leukozytenchemotaxis im Labor experimentell bestimmen zu können.

Für die Bestimmung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beschrieb BOYDEN<sup>38</sup> erstmals eine Technik, die als BOYDEN-Kammer-Methode bezeichnet wird. Die dabei verwendete Kammer wurde mehrfach modifiziert und besteht heute aus einem oberen Kompartiment, welches die Testzellen (z. B. Lymphozyten) enthält, und einem unteren Kompartiment, in dem sich der chemotaktische Stimulus befindet. Beide Kammerteile sind durch einen Filter voneinander getrennt, dessen Beschaffenheit ebenfalls im Laufe der Zeit modifiziert wurde.

Die anfangs verwendeten mehrere Zelldurchmesser dicken Filter aus Zellulosenitrat/-acetat erforderten entweder sehr lange Inkubationszeiten („lower-surface-count“<sup>44</sup>) oder eine zeitaufwendige Suche der im Filter befindlichen Zellen mit dem Mikroskop („leading-front“-Methode<sup>31</sup>). Mit beiden Methoden war zwar eine gute Unterscheidung von zufälliger und chemotaktisch stimulierter Wanderung der Zellen möglich, die Auswertung einer großen Anzahl von Proben unter dem Mikroskop aber sehr zeitaufwendig<sup>45</sup>.

Eine deutliche Verbesserung vor allem für die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben auf darin enthaltene chemotaktische Stimuli brachten Methoden zur indirekten Messung der gewanderten Zellen. Entweder wurden die Zellen radioaktiv markiert<sup>45</sup> oder eines ihrer zytoplasmatischen Enzyme zum Nachweis verwendet (z. B. Lactose-Dehydrogenase<sup>46</sup>). Hierbei kamen als Filter erstmals sehr dünne (10µm starke) Polykarbonatmembranen mit Poren zum Einsatz.

## **4.1.2 Biologisches Verfahren zur Messung Lymphozyten-chemotaktischer Aktivität**

### **4.1.2.1 Chemotaktisch stimulierte Migration in der Multikammer**

Für die Fragestellung dieser Arbeit ist die Möglichkeit wichtig, eine große Anzahl von Proben (die Fraktionen der HPLC) gleichzeitig und im Doppelansatz zu testen. Zur Messung ihres Gehaltes an für Lymphozyten chemotaktisch aktiven Substanzen bot sich die Verwendung einer von FALK *et al.*<sup>47</sup> beschriebenen 48-Loch-Multikammer an (*Abbildung 2*).

Zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung einer chemotaktisch stimulierten Migration der Zellen ist eine Methode geeignet, bei der die Zellen durch eine Polykarbonatmembran mit Poren, dem sogenannten Filter, wanderten und sich an der Unterseite anheften. Dort können sie angefärbt und per Augenschein oder Densitometrie quantifiziert werden. Routinemäßig angewendet wurde diese Methode beispielsweise zur Messung der chemotaktischen Aktivität von Monozyten bzw. von aus diesen hervorgegangenen dendritischen Zellen<sup>26</sup>.

Mit Lymphozyten als Testzellen hingegen war die Messung chemotaktisch stimulierter Migration sehr viel problematischer<sup>48</sup> (vgl. *Kapitel 3.1.2*). Die ersten Arbeiten hierzu beruhten auf der Beobachtung von Lymphozyten, die durch Plasmagerinsel hindurchwanderten<sup>49,50</sup>. Ein Mikroporen-Filterassay wurde für Lymphozyten erstmals von RUSSELL *et al.*<sup>51</sup> beschrieben. Die Lymphozyten hafteten jedoch nur sehr schwach an den Filtermembranen. Daher wurde zur Bestimmung Lymphozyten-chemotaktischer Aktivität später häufig ein System von Ein-Loch-Kammern<sup>39</sup> eingesetzt, bei dem nicht die Färbung des Filters sondern die Anzahl der hindurchgewanderten Zellen gemessen wurde. Aufgrund eines höheren Volumens dieser Kammer im Vergleich zu einer Vertiefung der Multikammer wurde dabei eine höhere Anzahl von Zellen pro Messung benötigt. Auch die Auswertung durch Zellzählung der gewanderten Zellen für jeden Einzeltest erforderte erheblich höheren Aufwand als beispielsweise die Bewertung der Färbung von 48 Feldern auf dem Filter einer Multikammer.

Die zu Beginn der Untersuchungen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Lymphozytenchemotaxis unter Verwendung einer Multikammer<sup>25,52,53</sup> lieferten zunächst keine eindeutigen Ergebnisse. Die Filterfärbung war stets sehr schwach und die Unterscheidung zwischen stimulierter und zufälliger Migration nicht eindeutig. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, ein Testsystem zur Messung der chemotaktischen Migration von Lymphozyten in der 48-Loch-Kammer zu etablieren, bei dem die migrierten Zellen an der Unterseite der Filter zuverlässig fixiert und anschließend gefärbt werden konnten.

Das Anheften von peripheren Blutlymphozyten an unbeschichtete Filter konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, obgleich in einigen Arbeiten die Verwendung unbeschichteter Filtermembranen für Chemotaxisexperimente mit PBL beschrieben wurde<sup>25,54</sup>. Laut TAUB *et al.*<sup>55,56</sup> und verschiedener anderer Autoren müssen Chemotaxisfilter mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder sonstigen die Adhäsion fördernden Substanzen beschichtet sein, um ein Wandern und Anhaften von Lymphozyten *in vitro* zu ermöglichen. Daher wurden in den Untersuchungen für diese Arbeit die Filter vor Durchführung der Chemotaxisexperimente auf ihrer Unterseite beschichtet. Anfangs geschah dies mit Hilfe von humanem EDTA-Plasma. Darin enthaltenes Fibronektin begünstigte das Anheften von Zellen an Oberflächen<sup>29</sup>. Fibronektin ist jedoch selbst als haptotaktisch für (Maus-) Lymphozyten beschrieben worden<sup>57</sup> und könnte daher möglicherweise falsch positive Ergebnisse in den Chemotaxisexperimenten bewirken. Durch Beschichten der Filter mit Kollagen Typ IV aus humaner Plazenta<sup>58</sup> wurde eine bessere Anheftung der Lymphozyten an die Filter sowie eine bessere Unterscheidbarkeit zwischen Positiv- und Negativkontrollen erreicht.

#### 4.1.2.2 Verschiedene Testzellen im Chemotaxisassay

Deutliche Hinweise zeigen *Psoriasis vulgaris* als eine primär immunologische Erkrankung mit T-Lymphozyten als Mediatoren<sup>20,21</sup>. T-Zellen gehören zu den ersten Leukozyten, die in sich neu bildende Plaques infiltrieren<sup>22</sup>. Eine Linderung der Erkrankung ist mit Hilfe von anti-T-Zell-Therapeutika möglich (z. B. Cyclosporin A)<sup>22</sup>. Fallstudien über Knochenmarktransplantationen zeigten Heilung von Psoriasis bei Empfängern von Knochenmark gesunder Spender, umgekehrt entwickelten nicht an Psoriasis erkrankte Empfänger durch Knochenmark erkrankter Spender selber Psoriasis<sup>20</sup>. Ein chimäres Tiermodell wurde entwickelt, bei dem Plaque-freie Haut von Psoriasis-Patienten auf immundefiziente SCID-Mäuse („severe combined immunodeficiency“) transplantiert wurde. Hier konnte gezeigt werden, daß durch Injektion von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Hautspender Psoriasis im Transplantat ausgelöst wurde<sup>21</sup>. Die besondere Rolle von T-Lymphozyten für die Entwicklung psoriatischer Läsionen begründete die Wahl der Testzellen für diese Arbeit.

##### 4.1.2.2.1 Die Zelllinie HuT78

Die Verwendung der Zelllinie HuT78 eines humanen T-Zell-Lymphoms<sup>27</sup> ermöglichte die Variation und Optimierung anderer Parameter des Testsystems zur chemotaktisch stimulierten Migration bei stets identischen Testzellen. Lymphozyten aus Blutspenden zeigen spenderabhängige Variationen in Zusammensetzung der Subpopulationen, exprimierten Rezeptoren und ihrer chemotaktischen Aktivität<sup>59,60</sup>. Diese Variationen traten bei Verwendung einer Zelllinie nach identischen Kulturbedingungen nicht auf. Für HuT78 konnte außerdem gezeigt werden, daß sie in ihrer chemotaktischen Aktivität für verschiedene Mediatoren gut mit frisch isolierten T-Zellen vergleichbar sind<sup>60</sup>.

Nach Optimierung der Chemotaxisparameter mit Hilfe der HuT78-Zellen sollte die Übertragbarkeit der Versuchsbedingungen von der Zelllinie auf Lymphozyten aus peripherem

Blut getestet werden. Insbesondere wurde erwartet, daß die erforderliche Porengröße der Chemotaxisfilter bei HuT78 größer sein würde als bei Lymphozyten aus peripherem Vollblut, da HuT78-Zellen unter dem Lichtmikroskop erkennbar einen ca. doppelt so großen Durchmesser aufwiesen wie PBL. Auch hinsichtlich des exprimierten Sortimentes an Oberflächenrezeptoren und damit ihrer chemotaktischen Reaktion auf verschiedene Chemokine wurden Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen erwartet.

In den Untersuchungen zeigte sich, daß HuT78-Zellen trotz ihrer Größe im selben Maße wie PBL zu einer chemotaktisch stimulierten Migration durch eine Membran mit nur 5 µm weiten Poren in der Lage sind (vgl. *Abbildung 6*). Beide Zellpopulationen liegen in ihrem Durchmesser oberhalb der Porenweite, müssen sich also beim Passieren der Filtermembran plastisch verformen. Die Wahl von Filtern mit größerer Porenweite (z. B. 8 µm) würde ein passives „Hindurchfallen“ der Zellen durch den Filter ermöglichen und bewirkte in Vorversuchen tatsächlich ein verstärktes Hintergrundsignal, also eine stärkere Färbung der Filter in der Negativkontrolle.

#### 4.1.2.2 Periphere Blutlymphozyten

In dieser Arbeit wurden die Lymphozyten nicht direkt nach Isolierung aus Spenderblut in den Chemotaxisexperimenten eingesetzt, sondern immer erst in Kultur genommen und mit verschiedenen Substanzen aktiviert.

Aktivierte Lymphozyten zeigen stärkere chemotaktische stimulierte Migration als ruhende<sup>48</sup>. Ihre Fähigkeit, Endothelien bei Entzündungen zu passieren, ist nach Aktivierung erhöht<sup>61</sup>. Als Aktivatoren von Lymphozyten sind eine Reihe unterschiedlich wirkender Substanzen bekannt, z. B. das proinflammatorische Zytokin Interleukin (IL) -2, das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) oder ein Antikörper gegen den T-Zell-Rezeptor, OKT3<sup>62-64</sup>. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Wirkmechanismen werden bei der Aktivierung von Lymphozyten durch o. a. Substanzen unterschiedliche Chemokinrezeptoren exprimiert.

IL-2, selbst ein T-Zell-Chemotaxin<sup>64,65</sup>, erhöht die chemotaktische Aktivität von T-Lymphozyten für die Chemokine CCL21 und CCL19 (binden an CCR7<sup>66</sup>) und für CXCL11 (bindet an CXCR3<sup>24</sup>). Die Rezeptorexpression von CCR1, CCR2, CXCR4 und CX<sub>3</sub>CR1 wird bei IL-2-Vorbehandlung von T-Zellen gesteigert<sup>67-69</sup>. Die Expression von CCR5, CXCR1 und CXCR2 bleibt unbeeinflusst<sup>67,68</sup>. Laut BABA *et al.*<sup>23</sup> steigert IL-2 die Expression des Rezeptors CCR6 in T-Zellen, LIAO *et al.*<sup>70</sup> hingegen beschreiben, IL-2 habe keinen Einfluß auf die CCR6-Expression. PHA erhöht neben der Teilungsrate von T-Lymphozyten auch deren chemotaktische Aktivität für CCL21, CCL19<sup>66</sup> und IL-2<sup>64</sup>. Die Expression von CXCR4 wird durch PHA-Aktivierung gesteigert<sup>67</sup>, die von CCR5, CCR1 und CCR2 bleibt hingegen unbeeinflusst<sup>67,68</sup>.

OKT-3-stimulierte T-Zellen stellen laut TAUB *et al.*<sup>29</sup> ihre ursprüngliche chemotaktische Aktivität für MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , CCL5 (binden alle an CCR5) und CXCL8 (bindet an CXCR1 und 2) wieder her, die während der Kultur bei 37°C ohne Stimulus ab 2 Stunden nach der Isolierung aus Vollblut stark abgesunken war. OKT-3-stimulierte T-Lymphozyten sind stärker chemotaktisch aktiv für IP-10 (bindet an CXCR3) als unstimulierte<sup>56</sup>. Die T-Zell-Expression des CCL20-



Rezeptors CCR6 wird durch Vorbehandlung der Zellen mit OKT-3 nicht beeinflusst, die von CCR1 und CCR2 sogar gesenkt, auch wenn gleichzeitig mit IL-2 vorbehandelt wurde<sup>68,70</sup>. Experimente dieser Arbeit zeigen eine signifikante Steigerung der chemotaktischen Aktivität OKT-3-stimulierter PBL für CCL19 gegenüber IL-2-stimulierten (*Abbildung 3*). Dies spricht für eine Steigerung der CCR7-Expression durch OKT-3-Stimulation<sup>66,71</sup>. JUTEL *et al.*<sup>72</sup> schreiben OKT-3 eine restimulierende Wirkung zu, d. h. die ursprünglich – im Spenderblut – vorhandene Aktivität von T-Zellen, die bei nichtstimulierender Kultivierung binnen Stunden absank, würde wieder hergestellt. Dies bedeutete eine Spenderabhängigkeit für die T-Zellaktivität und damit eine Variabilität der individuellen Zellpräparationen in den Chemotaxisexperimenten. Wurde OKT-3, wie in dieser Arbeit, an die Oberfläche der Kulturgefäße gebunden, stimulierte es zusätzlich die Proliferation von T-Zellen<sup>73</sup>.

Auch einem Bestandteil des in dieser Arbeit verwendeten Kulturmediums, dem FCS, wird von einigen Autoren eine T-Zell-aktivierende Wirkung zugeschrieben<sup>64,74</sup>. Solch ein Befund konnte in dieser Untersuchung jedoch nicht bestätigt werden. Er ist daher möglicherweise abhängig von der individuellen Zusammensetzung des fetalen Kälberserums oder der T-Lymphozytenpopulation.

#### 4.1.2.2.3 Th1-Lymphozyten

Die aus der erkrankten Haut von Psoriasis-Patienten isolierten „skin homing lymphocytes“ (SHL) waren nach neueren Studien überwiegend (zu 75%) Lymphozyten vom Th1-Typ<sup>10,75,76</sup>. In dieser Arbeit wurden Chemokine gesucht, die bei Psoriasis-Patienten die SHL zur Wanderung in die erkrankte Haut veranlassen können. Zur Steigerung der Effizienz der chemotaktischen Wanderung (d. h. dem Wandern eines höheren Prozentsatzes der eingesetzten Zellen) war daher die Isolierung und Anreicherung von Th1-Zellen aus peripherem Blut zur Suche nach diesem postulierten Chemokin sinnvoll. Diese Anreicherung wurde durch Kultivierung der isolierten PBMC mit IL-12, Phytohaemagglutinin und polyklonalen anti-IL-4-Antikörpern nach einer Methode von BONECCHI *et al.*<sup>30</sup> erreicht. Die nachfolgende Behandlung der so Th1-angereicherten Zellen mit IL-2 aktivierte ihre Fähigkeit zur chemotaktisch stimulierten Migration<sup>68,69</sup> und führte außerdem zur Vermehrung der Zellen<sup>77,78</sup>.

Unter den beschriebenen Kulturbedingungen verblieben keine in den PBMC noch vorhandenen Monozyten in den zur Chemotaxis eingesetzten TH1-Lymphozyten. Der Nachweis, daß sich unter den Th1-angereicherten und aktivierten Zellen keine chemotaktisch aktiven Monozyten mehr befanden, wurde durch Negativkontrolle mit fMLP (chemotaktisch für Monozyten<sup>79</sup>, aber praktisch nicht für T-Lymphozyten<sup>80</sup>) in der Chemotaxis und mittels Durchflußzytometrie (Messung der für Monozyten spezifischen CD14-Expression) erbracht (*Abbildung 4 A*). Da Lymphozyten vom Th1-Typ IFN- $\gamma$  sezernieren<sup>81</sup>, konnte mit Hilfe von durchflußzytometrischen Messungen der IFN- $\gamma$ -Sekretion der Erfolg einer Anreicherung von Th1-Lymphozyten auf über 60% der eingesetzten Zellen bestätigt werden (*Abbildung 4 B*).

### 4.1.3 Chemotaktische Aktivität für bereits bekannte Chemotaxine

Auf der Suche nach geeigneten Positivkontrollen für die chemotaktischen Untersuchungen wurde eine Reihe von bereits als Lymphozyten-chemotaktisch bekannten Substanzen getestet. Die Erkennung einer chemotaktisch wirksamen Substanz durch Zellen ist von der Zusammensetzung auf der Zelloberfläche exprimierter Rezeptoren abhängig. Die drei unterschiedlichen Zellpopulationen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, waren unterschiedlich aktiviert. HuT78-Zellen zeigten bereits einen aktivierten Phänotyp, wenn sie einer exponentiell wachsenden Kultur ohne stimulierendes Agens entnommen wurden<sup>60</sup>. Die PBL stellen laut Taub et al.<sup>29</sup> nach Aktivierung mit anti-CD3-Antikörpern ihre ursprüngliche Aktivität für einige CC-Chemokine wieder her. Die Th1-angereicherten Zellen waren mit Hilfe von IL-2 aktiviert worden<sup>68,69</sup>. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Testzellen und dieser verschiedenen Aktivierungszustände wurden die Chemotaxine meist an allen drei Zellpopulationen getestet.

*Komplement-Fragment 5a* (C5a) ist ein Anaphylatoxin und Glykoprotein mit einem Kohlenhydrat-Anteil von 3,0 kDa und einer Peptidkomponente mit einem Molekulargewicht von 8,2 kDa. Es aktivierte laut ZACHARIAE<sup>60</sup> Zellen der Linie HuT78. Dies konnte unter den hier verwendeten Bedingungen für C5a-Konzentrationen zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-14}$  M nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür mag die Abspaltung eines Argininrestes am Carboxyterminus von C5a durch eventuell im Medium vorhandene Carboxypeptidasen sein<sup>82</sup>. Das resultierende C5a<sub>des arg</sub> könnte andere chemotaktische Eigenschaften für HuT78-Zellen besitzen. ZACHARIAE *et al.*<sup>59</sup> fanden auch chemotaktische Aktivität für C5a in frisch aus Vollblut isolierten T-Zellen. Allerdings variierte diese Aktivität stark zwischen verschiedenen Blutspendern<sup>60</sup>. Diese Variation machte C5a als Positivkontrolle für die Untersuchungen dieser Arbeit ungeeignet.

Alle übrigen hier untersuchten Chemotaxine sind Peptide mit einer Molekülmasse von etwa 8 bis 10 kDa und einer charakteristischen Anordnung von Cysteinresten<sup>83</sup>. Sie werden unter dem Begriff Chemokine zusammengefaßt und lassen sich in vier Untergruppen gliedern: Die Mitglieder der CXC-Chemokine ( $\alpha$ -Chemokine) besitzen nahe ihrem aminoterminalen Ende zwei Cysteinreste mit einer weiteren Aminosäure dazwischen. Bei den CC-Chemokinen ( $\beta$ -Chemokine) liegen die beiden Cysteinreste unmittelbar nebeneinander. Beide Gruppen haben zwei weitere Cysteine an spezifischen Positionen im Molekül. Eine dritte Untergruppe von Chemokinen besitzt insgesamt nur zwei Cysteinreste. Diese werden daher als C-Chemokine ( $\gamma$ -Chemokine) bezeichnet (z. B. XCL1<sup>84</sup>). CX<sub>3</sub>CL1 ist ein membrangebundenes Glykoprotein mit drei Aminosäureresten zwischen den beiden aminoterminalen Cysteinresten. Es wird daher als CXXXC-Chemokin bezeichnet (auch CX<sub>3</sub>C)<sup>85</sup>.

CCL2 (Monozyten-chemotaktisches Protein 1, MCP-1) ist ein CC-Chemokin von 8,6 kDa Molekulargewicht und bindet an den CC-Chemokinrezeptor (CCR) 2<sup>86</sup>. CCL2 ist als Monozytenchemokin beschrieben worden. Neueren Erkenntnissen zufolge ist es unter

bestimmten Bedingungen auch für T-Zellen chemotaktisch wirksam. TAUB *et al.*<sup>87</sup> und LOETSCHER *et al.*<sup>88</sup> fanden chemotaktische Aktivität von CD<sup>4+</sup>- und CD<sup>8+</sup>-T-Zellen für CCL2. Frisch isolierte PBL waren nicht aktiv<sup>88</sup>. CARR *et al.*<sup>89</sup> aktivierten die T-Zellen mit Mitogen und fanden heraus, daß die gewanderten Zellen ausschließlich aus T-Gedächtniszellen bestanden. Dennoch konnte unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen keine chemotaktische Aktivität von Lymphozyten für 10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-11</sup> M CCL2 ermittelt werden. HuT78-Zellen schließlich zeigen einen T-Helfer-Phänotyp<sup>90</sup>. CCL2 war daher als Positivkontrolle für keine der Zellpopulationen geeignet.

CCL5 („regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted“, RANTES) ist ein CC-Chemokin mit 7,8 kDa Molekulargewicht und bindet an die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5<sup>86</sup>. Es wurde als chemotaktisch aktivierend für T-Gedächtniszellen beschrieben<sup>91,92</sup>. Auch CCL5 war unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen nicht meßbar aktiv für PBL oder HuT78-Zellen. Als Grund hierfür wird, wie bei CCL2, die zu geringe Expression der Rezeptoren CCR-1, -3 und -5 auf HuT78-Zellen vermutet.

CXCL8 (Interleukin 8, IL-8) ist ein CXC-Chemokin mit einem Molekulargewicht von 8,9 kDa und bindet an die CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR) 1 und 2<sup>86,93</sup>. Es wird von einigen Autoren als Chemokin beschrieben, welches chemotaktische Aktivität für PBL<sup>25</sup> bzw. T-Zellen besitzt<sup>59</sup>. Für keine der hier verwendeten Zellpopulationen konnte dies mit den in dieser Arbeit verwendeten Chemotaxisparametern bestätigt werden. Selbst die von TAUB *et al.*<sup>29</sup> beschriebene Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-CD3-Antikörpern erbrachte mit CXCL8-Konzentrationen zwischen 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-10</sup> M keine chemotaktische Aktivität. Die meisten Publikationen unterstützen diesen negativen Befund (z. B. LOETSCHER *et al.*<sup>88</sup>). SWENSSON *et al.*<sup>94</sup> injizierten CXCL8 intrakutan in menschliche Haut. Über Biopsieentnahme konnte nachgewiesen werden, daß ab ca. 1 h nach Injektion neutrophile Granulozyten und Monozyten in die Haut infiltrierten, jedoch keine Lymphozyten, auch nicht nach bis zu 5 h. Eine Ursache für diese insgesamt widersprüchlichen Ergebnisse mag die Existenz verschiedener CXCL8-Varianten sein<sup>39</sup>, die sich jeweils in ihrem aminoterminalen Ende unterscheiden. Die aminoterminalen Sequenz bei Chemokinen ist entscheidend für ihre Spezifität, d. h. für ihre chemotaktische Wirkung auf bestimmte Leukozytenpopulationen<sup>86</sup>.

CCL19 („EPSTEIN-BARR virus-induced molecule 1 ligand chemokine“, ELC) ist ein CC-Chemokin mit 8,8 kDa Molekulargewicht und bindet an CCR7<sup>86</sup>. Es wurde als Chemotaxis aktivierendes Chemokin sowohl für T- als auch für B-Lymphozyten beschrieben<sup>95</sup>. In der Gruppe der T-Lymphozyten aktiviert CCL19 gleichermaßen ruhende (CD45RA<sup>+</sup>) wie T-Gedächtniszellen (CD45RO<sup>+</sup>). Es aktiviert sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, erstere stärker. In den Messungen dieser Arbeit konnten für alle drei Testzellpopulationen chemotaktische Aktivitäten für CCL19 gemessen werden. Diese waren auch bei einer Chemokinkonzentration von 10<sup>-9</sup> M noch eindeutig erkennbar und zeigten bei 10<sup>-8</sup> M stärkere Färbungen der Filter als für alle anderen untersuchten Chemokine (vgl. *Abbildung 6*). Diese deutlichen Signale sowie das in der Literatur beschriebene breite Spektrum an CCL19-chemotaktisch aktiven Lymphozyten machten CCL19 zur idealen Positivkontrolle für alle drei verwendeten Testzellpopulationen.

CCL17 („thymus and activation-regulated chemokine“, TARC) ist ein CC-Chemokin von 8,0 kDa Molekulargewicht. Es bindet an CCR4<sup>86,96</sup>. CCL17 aktiviert HuT78-Zell-<sup>52</sup> und Th2-Chemotaxis. Th1- und B-Lymphozyten exprimieren keinen CCR4 und sind daher nicht chemotaktisch aktiv für CCL17<sup>96,97</sup>. In den Experimenten dieser Arbeit wurde eine chemotaktische Aktivität der HuT78-Zellen für CCL17 bei Konzentrationen von  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  M bestätigt (vgl. *Abbildung 6*). Entsprechend der Literatur zeigten Th1-angereicherte Lymphozyten keine chemotaktische Aktivität für CCL17. Auch in den PBL schien die Anzahl von Th2-Lymphozyten zu gering für ein positives Signal gewesen zu sein. Sicher besteht bei verschiedenen Spendern eine hohe Variabilität im Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen in den PBL. Aufgrund der negativen Befunde bei den Testzellen scheidet CCL17 als Positivkontrolle aus.

CXCL12 $\alpha$  („stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ “, SDF-1 $\alpha$ ) und CXCL12 $\beta$  (SDF-1 $\beta$ ) sind CXC-Chemokine mit den Molekulargewichten 8,0 und 8,5 kDa. Sie binden an den Rezeptor CXCR4<sup>86</sup>. Beide sind als potente Chemokine für Lymphozyten beschrieben worden<sup>98</sup>. Hierbei wirken sie besonders auf ruhende T-Lymphozyten<sup>67,86</sup>. Diese Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt.  $10^{-8}$  M CXCL12 $\alpha$  aktivierte eine chemotaktische Migration OKT3-stimulierter, peripherer Blutlymphozyten. Diese war auch bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M noch zu erkennen (vgl. *Abbildung 6*). In den Th1-angereicherten Zellen war der Anteil ruhender Zellen geringer und eine chemotaktische Aktivität für CXCL12 $\alpha$  und - $\beta$  war nur bei einer Chemokinkonzentration von  $10^{-8}$  M zu erkennen. Im Vergleich mit CCL19 waren CXCL12 $\alpha$  und - $\beta$  weniger gut als Positivkontrolle geeignet.

#### 4.1.4 Die Wahl des biologischen Materials

Viele der bisher gefundenen Chemokine wurden über Sequenzhomologien zu bereits bekannten Chemokinen identifiziert. Ihre Gene wurden mit Hilfe von cDNS-Datenbanken kloniert und rekombinant exprimiert. Die so gewonnenen Substanzen wurden dann auf ihre die Chemotaxis stimulierenden Eigenschaften getestet (z. B. CCL17, CCL20, CCL19, CCL21 und CCL18<sup>99</sup>).

mRNS-Expression von CCL2 wurde in psoriatischen Plaques, aber nicht in gesunder Haut gefunden<sup>100</sup>. Immunoreaktivität gegen CCL5 wurde in Psoriasis-Hautbiopsien gefunden<sup>91,101</sup>. Dennoch konnte die biologische Aktivität von CCL5 oder von CCL2 in psoriatischer Haut nie mittels eines biologischen Ansatzes nachgewiesen werden.

Der in dieser Arbeit gewählte methodische Ansatz bestand in der Untersuchung biologischen Materials (Psoriasis-Hautschuppen und Fersenkallus-Hornmaterial) mit Hilfe von Lymphozyten des peripheren Blutes als Chemotaxistestzellen. Dies erlaubte eine sehr viel bessere Annäherung der Untersuchungsmethoden an die *in vivo*-Situation als die oben als Beispiele genannten indirekten Methoden des Chemokinnachweises.

Chemokine können für die spezifische Rekrutierung von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen verantwortlich sein<sup>83</sup>. Die meisten Chemokine werden unter entzündlichen Bedingungen hauptsächlich in den erkrankten Geweben gebildet. Deshalb wurde

ihre höchste Konzentration dort und nicht im Plasma des Blutes erwartet und gefunden (z. B. CXCL8, C5a<sub>des arg</sub>, CXCL1 (GRO- $\alpha$ ), CCL5<sup>39</sup>). Gewebeeinfiltration mit Monozyten und Th-Lymphozyten gehört zu den frühesten immunohistologischen Veränderungen neu entstehender psoriatischer Plaques<sup>12,102</sup>. Auch in chronischen Plaques wurde ein entzündliches Infiltrat nachgewiesen, das vorwiegend aus Th1-Lymphozyten (den SHL) und neutrophilen Granulozyten bestand<sup>10</sup>. Zur Isolierung möglicher Chemotaxine für Lymphozyten, die an der Entstehung oder der Fortentwicklung von Psoriasisläsionen beteiligt sein könnten, bot sich daher Hautschuppenmaterial von Psoriasispatienten als Quelle an. Es liegt in großer Menge ohne weitere Beeinträchtigung der Patienten, wie z. B. bei Biopsieentnahme, vor und kann mit einer Kombination chemischer und physikalischer Methoden zur Isolierung von Inhaltsstoffen aufgearbeitet werden.

Als Gegenprobe zu diesem aus erkranktem Gewebe stammenden Material wurde vergleichbares Gewebe von gesunder Haut nicht an Psoriasis erkrankter Personen, Hornmaterial von Fersenkallus, für die Untersuchungen genutzt. Eine Substanz, die in beiden Extrakten zu vergleichbaren Anteilen vorkäme, könnte nicht allein Ursache für die Psoriasisläsionen sein.

Kulturüberstände primärer Keratinozyten bzw. der Keratinozytenzelllinie HaCaT sowie von primären Fibroblasten wurden untersucht, weil die Möglichkeit bestand, daß Zellen der Epidermis oder Dermis die Substanz (-en) produzieren, die Lymphozyten in die Haut einwandern läßt (lassen). Zusätzlich wurden primäre Fibroblasten von Psoriasis- und von Neurodermitis-Patienten isoliert und auf die Bildung von Lymphozyten-Chemokinen hin untersucht.

Wie bei der Psoriasis sind auch bei einigen atopischen Erkrankungen T-Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat in der Haut zu finden. Allergene sind in der Lage, bei Atopikern eine derartige Reaktion hervorzurufen. Um solch einen Reiz *in vitro* zu simulieren, wurden primäre Keratinozyten mit Kontaktallergenen, Extrakten aus Latex oder aus Hausstaubmilben (Spezies *Dermatophagoides pteronyssinus*), kultiviert und die Überstände daraus untersucht.

Als Gegenprobe zu den Zellen der äußerlich sichtbaren Haut wurden Überstände der Bronchialepithel-Zelllinie A549 als Repräsentant eines hornzellfreien Epithels untersucht.

Von vielen Autoren wird vermutet, daß außer T-Lymphozyten auch den Monozyten eine Schlüsselfunktion bei der Induktion neuer Psoriasisläsionen zukommt (z. B. VALDIMARSSON *et al.*<sup>103</sup>). Außerdem sind die aus Monozyten hervorgegangenen dendritischen Zellen für ihre Wechselwirkung mit T-Lymphozyten im Zusammenhang mit Psoriasis bekannt<sup>104</sup>. Neben ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen für die immunologische Aktivierung von Lymphozyten<sup>105</sup> ist bei ihnen auch die Expression von Lymphozyten-Chemokinen beschrieben worden (z. B. CCL19: NGO *et al.*<sup>106</sup>; MDC: TANG & CYSTER<sup>107</sup>). Da diese Interaktionen auch an der Entstehung oder dem Fortschreiten einer Psoriasis-Erkrankung beteiligt sein könnten, wurden Überstände von aus Monozyten hervorgegangenen dendritischen Zellen auf das Vorhandensein von Lymphozyten-chemotaktischen Faktoren hin untersucht.

## 4.2 Chemotaktische Aktivität in HPLC-Fractionen der Extrakte und Überstände

### 4.2.1 Strategie der Aufreinigung in der HPLC

Die Extraktion von Proteinen und Polypeptiden aus Psoriasis-Hautschuppen und aus Fersenkallus wurde mit Ethanol bei einem pH-Wert von 3-4 durchgeführt. Die Verwendung eines organischen Lösungsmittels wie Ethanol führte zu einem verbesserten Ablösen der sehr hydrophoben Chemokine von Oberflächen. Unter pH-neutralen Bedingungen bewirkt Ethanol jedoch auch eine verstärkte Freisetzung feinen, nicht filtrierbaren Materials, welches durch Verstopfen der Chromatographiesäulen die HPLC stört. Durch einen mit Zitronen- und Ameisensäure eingestellten sauren pH-Wert wurde dies verhindert<sup>39</sup>. Außerdem erbrachte eine Extraktion unter sauren Bedingungen eine Verringerung der in den Extrakten unerwünschten Proteine mit hohem Molekulargewicht sowie eine verbesserte Extraktion Matrix-gebundener Proteine<sup>34,108</sup>.

Die Aufreinigung der Extrakte und Zellkultur-Überstände mit Hilfe der HPLC fand entsprechend einer von SCHRÖDER<sup>39</sup> beschriebenen Strategie statt.

Da viele Chemokine durch eine Häufung basischer Aminosäuren Heparin-bindende Eigenschaften besitzen<sup>109</sup>, wurde im ersten Reinigungsschritt eine Heparin-Sepharose-Säule verwendet. Aus dem selben Grund wurde mit einer Ausnahme (Lauf 3, *Tabelle 8*) jeweils der Heparin-bindende Anteil weiter aufgetrennt. In einer Auftrennung mit der in dieser Arbeit verwendeten Kombination von HPLC-Säulen wurden die in den biologischen Materialien enthaltenen Proteine und Polypeptide zunächst nach ansteigender Hydrophobizität aufgetrennt (Nucleosil C8). Daraufhin erfolgte eine Trennung entsprechend der in den Molekülen vorhandenen positiven Ladungen (MonoS) und im Anschluß daran wieder eine Auftrennung nach Hydrophobizität („WidePore“ Butyl), hier jedoch mit gegenüber der Nucleosil-C8-Säule veränderter Spezifität. In der Gelfiltrationschromatographie (TSK G2000SW) erfolgte eine Auftrennung der Polypeptide nach ihrer Größe und der Anzahl ihrer Ladungen<sup>34</sup>. Die sauren Bedingungen (TFA bzw. Ammoniumformiat im Laufmittel) erlaubten eine optimale Trennung der Polypeptide mit geringerer Masse (1-20 kDa) von höhermolekularen<sup>34,108</sup>.

Die Leistungsfähigkeit dieser HPLC-Strategie zur Aufreinigung von Chemokinen wurde mehrfach unter Beweis gestellt (u. a. für CXCL8 und CXCL1<sup>10,39</sup>). Parallel zu den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden die HPLC-Fractionen aus Psoriasis-Schuppenextrakt auf ihre chemotaktische Aktivität für dendritische Zellen hin getestet. Dabei führte eine Aufreinigung mit der oben beschriebenen Folge von HPLC-Trennungen zur Isolierung von C5a oder eines seiner Derivate<sup>110</sup> (siehe auch SCHRÖDER *et al.*<sup>111</sup>, TAKEMATSU & TAGAMI<sup>112</sup>).

### 4.2.2 Der Übergang von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe

Zellen benötigen auf ihren gerichteten Wanderungen Richtungsinformationen. Diese können entweder auf Gradienten von löslichen Lockstoffen beruhen (Chemotaxis), oder auf

anziehenden bzw. abstoßenden Stoffen, die an die extrazelluläre Matrix oder die Zelloberflächen gebunden sind (geleiteter Weg)<sup>17</sup>. Für die Infiltration von Leukozyten in psoriatische Läsionen spielt bereits der Übergang aus den Blutgefäßen in die erkrankte Haut eine wichtige Rolle, denn zunächst zirkulieren die meisten Leukozyten im Blut. Dieser Übergang wird durch komplexe Interaktion zwischen den Endothelzellen der Blutgefäße, den Leukozyten und Chemokinen ermöglicht. Das Einwandern von Immunzellen in ein Gewebe erfolgt in vier Schritten.

Bei Auftreten einer Entzündung aktivieren akute Entzündungsmediatoren (Histamin, Thrombin, Komponenten des Komplementsystems) zuvor ruhende Gefäßendothelzellen. Diese Aktivierung bringt intrazellulär in sogenannten WEIBEL-PALADE-Körpern gespeichertes P-Selectin<sup>113</sup> dazu, schnell an die Zelloberflächen der Endothelzellen transportiert zu werden (maximale Expression nach ca. 10 min)<sup>113-115</sup>. E-Selectin wird nach Aktivierung der Endothelzellen durch IL-1, TNF- $\alpha$  oder bakterielle Lipopolysaccharide<sup>116,117</sup> *de novo* synthetisiert und erreicht seine maximale Expression nach ca. vier Stunden<sup>116,118,119</sup>. Beide Selectine binden an spezifische Oligosaccharide auf den Oberflächen der Leukozyten. Beispielsweise findet beim Einwandern von Lymphozyten in die Haut eine Wechselwirkung zwischen kutanem Lymphozyten-assoziiertem Antigen (CLA) und E-Selectin statt<sup>120</sup>. Die Leukozyten adhären schwach an das Endothel und „rollen“ im Blutstrom daran entlang.

Am Entzündungsherd in das umgebende Gewebe entlassene Chemokine (z. B. CXCL12, CCL21, CCL19 und CCL20<sup>18</sup>) gelangen durch das Endothel benachbarter Blutgefäße und werden auf dessen Innenseite an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden<sup>121</sup>. Die „rollenden“ Leukozyten erkennen diese gebundenen Chemokine durch spezifische Rezeptoren und *aktivieren* über eine G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Signaltransduktion ihre Integrine<sup>18</sup>.

Die Integrine werden dadurch veranlaßt, fest an Adhäsionsmoleküle der Epithelzellen zu „*arretieren*“, welche strukturell mit den Immunoglobulinen verwandt sind<sup>17</sup> (z. B. Leukozyten-funktionsassoziiertes Antigen-1 (LFA-1) an Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), -2 und -3<sup>122-125</sup>).

Nun folgt die *Diapedese* der „arretierten“ Leukozyten durch die Endothelzellschicht hindurch in das Gewebe. Hier folgen sie den Gradienten freier oder über Heparansulfat-Proteoglykane an Zelloberflächen und extrazelluläre Matrix gebundener Chemokine<sup>86</sup> und gelangen so z. B. in die psoriatischen Plaques erkrankter Haut. Auf diese Weise bestimmen neben der Art der gebildeten Zytokine und Chemokine auch die an den Oberflächen der Endothelzellen und der Leukozyten gezeigten Adhäsionsmoleküle darüber, welche Leukozytenpopulationen an den Ort der Entzündung gelangen.

Das in dieser Arbeit gesuchte Chemotaxin ist demzufolge entweder für Schritt zwei verantwortlich, die Aktivierung der „rollenden“ T-Zellen in den peripheren Blutgefäßen, oder es wirkt nach Schritt vier, dem Übergang der Zellen in die Gewebe. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß die gesuchte Substanz an beiden Prozessen beteiligt wäre. Dies wird in den nachfolgenden Kapiteln im Zusammenhang mit den verwendeten biologischen Materialien diskutiert (*Kapitel 4.2.4 bis 4.2.9*).

### 4.2.3 Das entzündliche Infiltrat bei Psoriasis

Neben einer Hyperparakeratose ist das wichtigste Merkmal psoriatischer Läsionen das Infiltrat einer Reihe von verschiedenen Entzündungszellen in der erkrankten Haut. Bei verschiedenen Formen der Psoriasis setzt sich dieses entzündliche Infiltrat unterschiedlich zusammen. Bei der eruptiven Psoriasis („Guttata“-Typ) mit ausgeprägter inflammatorischer Komponente sind neutrophile Granulozyten in der Epidermis herausragendes Merkmal. Darüber hinaus finden sich Monozyten und Makrophagen um die Blutgefäße herum sowie T-Zellen im Bereich der Basallamina. Bei der chronischen Plaquetyp-Psoriasis mit verstärkter Proliferation der Keratinozyten sind weniger Granulozyten im Infiltrat zu finden. Statt dessen findet man mononukleäre Zellen, im wesentlichen T-Lymphozyten, im Bereich der Basallamina und der Blutgefäße<sup>10</sup>. Diese T-Zellen sind bei der chronischen Plaquetyp-Psoriasis hauptsächlich vom Helfer-Typ (CD4<sup>+</sup>) sowie zu ca. 25% Suppressor-T-Zellen (CD8<sup>+</sup>)<sup>126</sup>. Eine weitere Gruppe aus Plaques isolierter T-Zellen, ca. 1%, ist negativ für beide Oberflächenmarker (CD4/CD8)<sup>76,127</sup>.

Auch das Muster der von den T-Zellen sezernierten Zytokine unterscheidet sich bei beiden Psoriasisformen. Aus Sekret von Guttata-Psoriasisläsionen isolierte CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten Interleukin (IL) -2, IL-10, GM-CSF und IFN- $\gamma$ <sup>75</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Plaquetyp-Psoriasis produzierten ebenfalls IL-2 und IFN- $\gamma$ , aber nur zu geringen Teilen IL-10. Zusätzlich wurde bei einigen die Bildung von TNF- $\alpha$  und IL-4 beobachtet<sup>76</sup>. Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß der überwiegende Teil (ca. 75%) der in psoriatischen Läsionen gefundenen Lymphozyten vom Th1-Typ sind<sup>76</sup>. VOLLMER *et al.*<sup>128</sup> fanden eine Gruppe von T-Zellen in psoriatischen Läsionen, die ein Zytokinmuster zeigten, welches weder vom Th1- noch vom Th2-Typ war. Diese Zellen bildeten IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-2 und IL-5, aber nicht IL-4 und waren in der Lage, *in vitro* die Teilungsrate von Keratinozyten zu steigern.

Auch Monozyten bzw. Makrophagen sind in der Lage, eine gesteigerte Proliferation der Keratinozyten zu bewirken. Monozyten sind die ersten Leukozyten, die in den Anfangsstadien der Psoriasis aus dem Blut in die Haut einwandern<sup>11</sup>. Sie werden möglicherweise über CCL2 (MCP-1) in die Haut gelenkt, welches bei Psoriasis von basalen Keratinozyten gebildet wird<sup>100</sup>. Eine Untergruppe der Monozyten, sogenannte „lining“ Makrophagen, wurden in psoriatischen Läsionen unter den Spitzen der epidermalen Retezapfen direkt unter der Basallamina gefunden<sup>13,14</sup>. Diese Zellen stehen über Fortsätze durch die Basalmembran hindurch direkt mit der untersten Schicht Keratinozyten in Verbindung<sup>13</sup>. Durch diese direkten Zellkontakte könnte mittels Mediatoren wie IL-6<sup>129,130</sup> oder CXCL8<sup>131</sup> die Teilungsrate der Keratinozyten beeinflußt werden.

Eine weitere Komponente des entzündlichen Infiltrats in psoriatischen Plaques besteht aus dendritischen Zellen. Sie entwickeln sich aus peripheren Blut-Monozyten<sup>15</sup> und exprimieren im Unterschied zu anderen dendritischen Zellen der Haut den Blutgerinnungsfaktor XIIIa auf ihrer Zelloberfläche<sup>15</sup>. Dendritische Zellen fanden sich in der oberen Dermis sowie in der Epidermis in direkter Umgebung von Lymphozyten<sup>16</sup>. Sie zeigten einen Phänotyp Antigen-präsentierender Zellen<sup>132</sup> und aktivierten *in vitro* unstimulierte T-Zellen aus dem peripheren Blut zu erhöhter Proliferation und zu einer verstärkten Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$ <sup>104</sup>. Die Expression von IL-4



und IL-10 durch T-Zellen wurde von den dendritischen Zellen nicht beeinflusst, folglich war die Interaktion der dendritischen mit T-Zellen zumindest überwiegend auf Th1-Lymphozyten begrenzt.

#### 4.2.4 Chemotaktische Aktivität in Psoriasis-Hautschuppenextrakten

Der entscheidende Ausgangsbefund für diese Arbeit bestand darin, daß mit der Entstehung oder dem Fortschreiten psoriatischer Läsionen bei der chronischen Plaquetyp-Psoriasis T-Lymphozyten, vornehmlich T-Helferzellen vom Typ 1, in die erkrankte Haut „gelockt“ werden. Hier sind sie in der oberen dermalen Schicht sowie der Epidermis der betroffenen Haut zu finden<sup>10,102</sup>. Ein dafür verantwortlicher „Lockstoff“ war bisher nicht bekannt und so wurde die Hypothese formuliert, daß dieser in hoher Konzentration in den entsprechenden Schichten der Haut, also auch in der Epidermis, zu finden sei. Hautschuppen von Psoriasispatienten bestehen im Wesentlichen aus nicht vollständig zu Kerneozyten (Hornzellen) differenzierten Keratinozyten<sup>3</sup>. Daher sollten auch die Hautschuppen Chemokine enthalten, die in großer Menge in der Epidermis erkrankter Haut vorkommen, also auch den gesuchten „Lockstoff“.

Neutrophile Granulozyten sind wie Th1-Lymphozyten ebenfalls Bestandteil des entzündlichen Infiltrates bei Psoriasis<sup>10</sup>. Chemotaxine für diese Leukozyten konnten erfolgreich aus Psoriasis-Hautschuppen isoliert werden (C5a<sub>des arg</sub>, CXCL1 sowie CXCL8<sup>82</sup>).

Die Ergebnisse der chemotaktischen Untersuchungen mit Psoriasis-Hautschuppenextrakt zeigten jedoch keine oder nur geringe Aktivität für Lymphozyten. Insbesondere bei den Th1-angereicherten Zellen war keinerlei chemotaktische Aktivität festzustellen (*Tabelle 8*). Unter Beibehaltung der Hypothese sind hierfür prinzipiell verschiedene Ursachen denkbar.

Das biologische Material könnte falsch gewählt sein. Käme beispielsweise das für ein Einwandern der SHL in die Haut verantwortliche Chemokin nur in der Dermis psoriatischer Plaques, nicht aber in der Epidermis vor, so wäre es nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in den Hautschuppen enthalten. Die SHL finden sich jedoch auch in der Epidermis<sup>10,102</sup>, so daß in diesem Fall eine weitere chemotaktisch wirksame Komponente postuliert werden müßte, die das Einwandern der SHL aus der Dermis in die Epidermis bewirkte. Diese hätte bei den Untersuchungen des Schuppenmaterials identifiziert werden müssen, sofern sie eine proteinartige Struktur hätte. Der *in vivo*-Situation näher wäre lediglich „frische“ Haut von Psoriasispatienten gewesen, die in Form von Biopsien – sogenannten Hautstanzen – tatsächlich in begrenztem Maße zur Verfügung gestanden hätte. Die Größe dieser Biopsien wäre jedoch zu gering, um die gesuchte Substanz in einer für die verschiedenen Reinigungsschritte der HPLC ausreichenden Menge zu extrahieren. Die Präparationen aus Hautschuppen enthielten jeweils 50 g Schuppenmaterial. Die Biopsien wogen höchstens 0,05 g, stellten also um den Faktor 1000 weniger Ausgangsmaterial dar.

Ein weiteres mögliches Problem wäre die chemische Modifikation des gesuchten Chemokins bei der Extraktion aus dem Schuppenmaterial in eine chemotaktisch inaktive Form gewesen.

Wenn der gesuchte „Lockstoff“ chemisch verwandt mit bekannten Chemokinen sein sollte, dann ist eine solche Inaktivierung unwahrscheinlich, da andere Chemokine bereits erfolgreich auf diesem Wege extrahiert wurden (u. a. CXCL8 und CXCL1<sup>39</sup>), ohne zuvor inaktiviert worden zu sein.

Der gesuchte „Lockstoff“ könnte auch eine andere chemische Beschaffenheit haben als die bekannten Chemokine, z. B. die eines Lipids. In diesem Fall wäre er durch eine auf Proteine und Polypeptide optimierte Extraktion nicht erfaßt worden. Bei einer Extraktion von Psoriasis-Hautschuppen (Präparation D) wurden sogar bewußt die Lipide mittels Ethylacetat entfernt, um die Ausbeute an Protein zu steigern.

Tatsächlich konnten in psoriatischen Läsionen eine Reihe von Arachidonsäurederivaten gefunden werden, z. T. in gegenüber gesunder Haut deutlich erhöhten Konzentrationen<sup>82,133</sup>. Der Vergleich der Biopsien von Psoriasispatienten im Bereich psoriatischer Läsionen mit nicht erkrankter Haut zeigte eine 25fach erhöhte Konzentration von Arachidonsäure. 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) war 82fach erhöht<sup>133</sup>, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 1,4fach sowie Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) 1,9fach<sup>134</sup>. PGE<sub>2</sub> hatte keine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, steigerte allerdings ihre chemotaktische Aktivität für Komplement-aktiviertes, humanes Serum<sup>135</sup>. SCANDELLA *et al.*<sup>136</sup> zeigten die Steigerung der CCR7-Expression in dendritischen Zellen durch PGE<sub>2</sub>, VAN EPPS *et al.*<sup>137</sup> eine migrationsfördernde Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf Neutrophile. ARMSTRONG<sup>138</sup> hingegen beobachtete eine Hemmung der chemotaktischen Aktivität dieser Zellen durch PGE<sub>2</sub>. PGF<sub>2α</sub> war nicht chemotaktisch für humane Granulozyten, steigerte aber deren chemotaktische Aktivität für Casein<sup>139</sup>. Für beide Prostaglandine sind keine chemotaktischen Aktivitäten beschrieben worden. Darüber hinaus ist ihr nur um 40 bzw. 90% vermehrtes Vorkommen in Psoriasisläsionen keine ausreichende Erklärung für das massive Einwandern von Th1-Lymphozyten in die Haut.

12-HETE wurde als chemotaktisch aktiv für neutrophile Granulozyten getestet, allerdings in hohen (mikromolaren) Konzentrationen<sup>140</sup>. Da 12-HETE in Psoriasisläsionen in sehr hoher Konzentration gefunden wurde, mag es tatsächlich als Chemoattraktor für Neutrophile eine Rolle spielen. Die Isoform 12(*R*)-HETE ist dabei die häufigere und auch die für Neutrophilenchemotaxis potentere Form. Als Quelle für 12-HETE in psoriatischen Läsionen werden Keratinozyten vermutet, obwohl diese fast ausschließlich die 12(*S*)-Isoform produzieren<sup>141</sup>. Eine Umformung von 12(*S*)-HETE über 12-oxo-Eicosatetraensäure zu 12(*R*)-HETE wird für wahrscheinlich gehalten<sup>82</sup>. Der 5-Lipoxygenase-Metabolit Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) wurde in biologisch aktiver Menge in Schuppenmaterial sowie der Epidermis von Psoriasisläsionen gefunden<sup>142-144</sup>. Es wurde als chemotaktisch aktiv für Neutrophile<sup>145</sup>, Eosinophile<sup>146</sup> und Monozyten<sup>147</sup> beschrieben. Als Quelle des LTB<sub>4</sub> werden in die Läsionen eingewanderte Neutrophile vermutet, da diese in hohem Maße LTB<sub>4</sub> bilden können<sup>148</sup>. Keratinozyten sind nicht in der Lage, LTB<sub>4</sub> zu bilden<sup>82</sup>. Über die chemotaktische Wirksamkeit von 12(*R*)-HETE sowie LTB<sub>4</sub> für Lymphozyten existieren widersprüchliche Aussagen. BACON *et al.*<sup>54</sup> sahen Lymphozytenchemotaxis mit 12(*R*)-HETE ab einer Konzentration von 5x10<sup>-7</sup> M, mit

LTB<sub>4</sub> sogar schon ab 10<sup>-10</sup> M<sup>149</sup>. Hierbei fanden allerdings Filter mit 8 µm Porenweite Verwendung, die in dieser Arbeit falsch-positive Resultate lieferten (*Kapitel 3.1.2*).

SCHRÖDER<sup>82</sup> stellte keine Lymphozyten-chemotaktische Aktivität für LTB<sub>4</sub> fest. Außerdem konnte er zeigen, daß physiologisch stimulierte Neutrophile (C5a, fMLP oder plättchenaktivierender Faktor (PAF) als Aktivatoren) keine Unterschiede in ihrer LTB<sub>4</sub>-Produktion zwischen Psoriasispatienten und gesunden Blutspendern zeigten. Eine verstärkte Bildung von LTB<sub>4</sub> bei Psoriasis scheint damit ausgeschlossen. Hinzu kommt, daß sowohl LTB<sub>4</sub> als auch 12(*R*)-HETE sogenannte Panleukotaxine sind, d. h. diese Mediatoren sind nicht spezifisch für bestimmte Leukozyten. Daher bieten sie keine ausreichende Erklärung für das bei Psoriasis beobachtete komplexe lokale und zeitliche Verteilungsmuster der infiltrierenden Leukozyten-Subtypen. Eine eventuelle Beteiligung von 12(*R*)-HETE an der Entstehung von Th1-Infiltraten in psoriatischen Läsionen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, weil, wie erwähnt, die Lipide bei der Herstellung der Psoriasis-Hautschuppenextrakte abgetrennt wurden.

Das Lipid PAF war als Mediator für Neutrophilen- und Eosinophilen-Chemotaxis bekannt, hatte aber in Läsionen nur eine geringfügig höhere Konzentration als in gesunder Haut<sup>150</sup>. Daher ist seine Beteiligung an einer Leukozytenchemotaxis bei Psoriasis unwahrscheinlich. Ein Derivat der Linolsäure, 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODD), wurde in stark erhöhter Konzentration in Psoriasissschuppen nachgewiesen<sup>151</sup>. MATZNER *et al.*<sup>152</sup> zeigten, daß 13-HODD nicht chemotaktisch für humane Neutrophile ist, HENRICKS *et al.*<sup>153</sup> berichteten, 13-HODD sei chemotaktisch für Granulozyten. Über eine Lymphozyten-chemotaktische Wirkung dieses Linolsäurederivates ist nichts bekannt. Weitere aus Psoriasisplaques isolierte Arachidonsäurederivate waren entweder für Leukozyten chemotaktisch inaktiv (15-HETE) oder kamen in extrem geringer Konzentration vor (8-, 9- und 11-HETE)<sup>82</sup>.

Als weitere mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis eines chemotaktisch aktiven Proteins oder Polypeptids in den Schuppenextrakten wäre mangelnde Sensitivität des Assaysystems denkbar. Die Nachweisgrenze für CCL19, CCL21, CXCL12α sowie CXCL12β lag mit dem hier verwendeten Assay bei 10<sup>-9</sup>M. Der Chemotaxisassay ist damit ähnlich sensitiv wie immunologische Nachweissysteme, z. B. ELISA, „Dot-“ oder „Western-Blot“. SHL sollten *in vivo* nicht sensitiver für chemotaktische Mediatoren sein als *in vitro*. *In vivo* findet Chemotaxis von T-Lymphozyten statt, denn sie sind als Infiltrat in der erkrankten Haut zu finden. Daher sollte ihre Sensitivität auch *in vitro* für einen Chemokinnachweis genügen.

Entscheidend für die Erkennung von Chemokinen durch die SHL ist die Expression von Oberflächenrezeptoren auf den Zellen<sup>43</sup>. Dabei entscheidet die Zusammensetzung dieser Rezeptoren darüber, auf welche Chemokine die Zellen reagieren können. Fehlten die bei den SHL für die Erkennung des gesuchten Chemokins exprimierten Rezeptoren auf den Testzellen, so wäre damit ein Auffinden dieses Chemokins in den Psoriasis-Hautschuppenextrakten nicht möglich gewesen. Da das für ein Einwandern der SHL in die psoriatischen Läsionen

ursächliche Chemokin nicht bekannt war, konnte auch nicht bestimmt werden, welche Rezeptoren die Testzellen für seine Erkennung exprimieren mußten. Aus diesem Grund wurden als Testzellen neben den unter spezifischen Bedingungen angereicherten und stimulierten Th1-Lymphozyten auch die gesammelten PBL des peripheren Blutes verwendet. Ihre Stimulation mit OKT3, einem Antikörper für den T-Zellrezeptor (CD3), sollte eine Reaktivierung bewirken<sup>72</sup>, d. h. die im peripheren Blut bereits exprimierten Rezeptoren wurden auch in der Kultur wieder zur Expression gebracht. Da auch die SHL vor ihrem Einwandern in die psoriatischen Läsionen im peripheren Blut zirkulierten, mußten sie bereits dort diejenigen Rezeptoren exprimiert haben, die für die Erkennung des gesuchten Chemokins verantwortlich waren, denn sonst wären sie nicht in der Lage, aus dem Blut in die Haut einzuwandern. Diese Rezeptoren wurden mit Hilfe von OKT3 auf den PBL wieder exprimiert.

Neue Ergebnisse von TERAKI *et al.*<sup>154</sup> zeigten grundsätzliche Unterschiede zwischen den exprimierten Rezeptoren auf T-Lymphozyten aus psoriatischen Plaques und denen auf T-Zellen des peripheren Blutes. So wurde beispielsweise CCR6 im peripheren Blut von ca. 3% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, in psoriatischen Läsionen hingegen von ca. 50 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die aus dem Blut in die Läsionen einwandernden T-Zellen sind also entweder eine sehr kleine Untergruppe aller im Blut vorkommenden, oder sie werden auf dem Weg in die erkrankte Haut zur Expression zusätzlicher Rezeptoren stimuliert. Dieser Tatbestand könnte eine weitere mögliche Ursache der mit den aus peripherem Blut isolierten Testzellen negativen Ergebnisse in Psoriasis-Hautschuppenmaterial sein. Aus psoriatischen Läsionen isolierte T-Zellen stehen jedoch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um damit chemotaktische Analysen wie die in dieser Arbeit vorgenommenen durchzuführen. Im zweiten Fall, der Veränderung von exprimierten Rezeptoren während des Einwanderns der T-Zellen, bliebe außerdem die Frage bestehen, was die Zellen zum Verlassen der Blutgefäße veranlaßt (vgl. *Kapitel 4.2.2*).

Denkbar wäre weiterhin, daß die SHL aus einem Subtypus bestehen, welcher in den Testzellen, auch den Th1-angereicherten, in zu geringem Maße vertreten war, um in der Chemotaxis sichtbar zu sein. Wenn sich diese speziellen Zellen vor Ort, also im psoriatischen Plaque, teilten, könnte dies die große Zahl der dort gefundenen SHL erklären, ohne daß Lymphozyten vom SHL-Subtypus in höherer Konzentration im peripheren Blut zu finden gewesen wären. Um dieses Problem ausschließen zu können, wäre eine Extraktion der SHL aus den Läsionen mit sofort anschließender chemotaktischer Testung notwendig gewesen. Die Extraktion einer genügenden Anzahl solcher Zellen wäre jedoch eine unzumutbare Beeinträchtigung der an Psoriasis erkrankten Spender gewesen. Um eine große Anzahl von Proben (die HPLC-Fractionen) auf chemotaktische Aktivität testen zu können, war eine große Anzahl von Testzellen erforderlich. Darüber hinaus spricht die hohe Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten Assaysystems gegen diesen Einwand, da auch die Wanderung einer relativ geringen Anzahl von Zellen gegenüber der Negativkontrolle sichtbar gewesen wäre.

Die negativen Chemotaxisresultate mit Psoriasis-Hautschuppenextrakten lassen darauf schließen, daß darin kein T-Zell-Chemokin in einer Menge vorhanden war, welche die Infiltration von SHL in psoriatische Läsionen begründen könnte. Um dennoch eine Quelle der für psoriatische Läsionen postulierten chemotaktischen Aktivität zu ermitteln, wurden Zellkulturüberstände getestet. Hierbei wurden Zellen kultiviert, die am Ort des Geschehens, also in der Haut, ohnehin in großem Umfang vorhanden sind, nämlich Keratinozyten und Fibroblasten. Da im entzündlichen Infiltrat frischer Läsionen noch vor den T-Lymphozyten Monozyten gefunden wurden, waren auch deren Kulturen bei ihrer Differenzierung zu dendritischen Zellen Teil der Untersuchung. Überstände von Zellkulturen einer Bronchialepithel-Zelllinie stellten das Modell eines hornzellfreien Epithels dar. Als Negativkontrolle zu Psoriasis-Hautschuppen diente Fersenkallus nicht an Psoriasis erkrankter Personen.

#### **4.2.5 Chemotaktische Aktivität in Kallusextrakten**

Fersenkallus diente dem Vergleich von Psoriasis-Hautschuppen mit biologischem Material aus gesunder Haut. Eine Substanz, die in beiden Materialien zu gleichen Anteilen vorkäme, könnte nicht an der Pathogenese von Psoriasis beteiligt sein. Da aber in Psoriasissschuppen praktisch keine chemotaktische Aktivität für Lymphozyten gemessen werden konnte, wurde die Analyse des Kallusextraktes obsolet. Erwartungsgemäß fand sich darin keine reproduzierbare Lymphozyten-chemotaktische Aktivität (*Tabelle 9*).

#### **4.2.6 Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen von Keratinozyten**

Keratinozyten sind ein wesentlicher Bestandteil der Epidermis. Wären sie in der Lage, ein Chemokin zu produzieren, welches auf T-Lymphozyten wirkt, so könnte dies eine Erklärung für das Infiltrieren psoriatischer Läsionen mit SHL sein. Da in gesunde Haut keine T-Zellen einwandern, war auch bei unstimulierten Keratinozyten in der Zellkultur keine Expression dieses potentiellen Chemokins zu erwarten. Primäre Keratinozyten wurden daher für eine Dauer von 48 h Kontaktallergenen ausgesetzt, Präparation J einer Nährlösung mit Latexextrakt und Präparation K mit Milbenextrakt. Die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (humane, adulte, immortalisierte Keratinozyten<sup>32</sup>) wurde mit TNF- $\alpha$  stimuliert, einem Endothelaktivator und Mediator lokaler Entzündungsreaktionen (Präparation L).

In der Chemotaxis zeigten HuT78-Zellen reproduzierbare Aktivität für die Überstände TNF $\alpha$ -stimulierter HaCaT. Obwohl keine für eine Reinigung der aktiven Substanz ausreichende Menge vorhanden war, stellte sich die Frage, warum diese Aktivität nicht in zu einem wesentlichen Teil aus Keratinozyten gebildeten Psoriasis-Hautschuppen gefunden wurde.

Die Hornzellen, die in Psoriasisläsionen die Schuppen bilden, sind im Vergleich zu den Hornzellen gesunder Haut unvollständig differenziert. Sie enthalten Zellkernreste und ihr Expressionsmuster für Keratine und Involukrin ist verändert. Während gesunde Keratinozyten ab der zweiten Schicht oberhalb der Basalmembran die Keratine 1 und 10 exprimieren, beginnen die Zellen in psoriatischer Epidermis an dieser Position mit der Expression von Keratin 6 und 16. Außerdem bilden sie bereits in dieser Zellschicht Involukrin, welches in

gesunder Haut erst ab der vierten Zellschicht gebildet wird und das normalerweise der Quervernetzung der Zellen untereinander dient<sup>3</sup>. Trotz dieser Unterschiede sind auch die Hornzellen psoriatischer Läsionen abgestorben, d. h. sie haben keinen eigenen Stoffwechsel mehr. Wäre das gesuchte Chemokin chemisch instabil, so könnte es sich in den toten Zellschichten durch physikalische oder chemische Einflüsse schnell verändern und damit chemotaktisch inaktiv werden. Ausgehend von schon bekannten Chemokinen und deren relativer Stabilität gegenüber Inaktivierung ist solch ein Effekt jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Auf Kunststoff kultivierte, normale Keratinozyten bilden einen ähnlichen Phänotyp aus wie psoriatische *in vivo*<sup>3</sup>. Dennoch müssen aufgrund der *in vivo* komplexen Interaktion mit Zytokinen und lipidartigen Mediatoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und anderer Zelltypen (z. B. mit Fibroblasten) andere Charakteristika für diese Zellen angenommen werden als für die *in vitro*-Keratinozyten. SAIAG *et al.*<sup>155</sup> zeigten, daß normale Keratinozyten in einem künstlichen Modell für lebende Haut stärker proliferierten, wenn psoriatische Fibroblasten in die Matrix eingefügt wurden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sich auch die Expression von Chemokinen bei Keratinozyten in Zellkultur von der in psoriatischer Haut vorkommender Zellen unterscheidet.

In den Kulturen primärer Keratinozyten, stimuliert mit Milben- bzw. Latexextrakt, war keine chemotaktische Aktivität meßbar. Einzig die HaCaT-Zelllinie produzierte chemotaktische Aktivität. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und erhöhter Temperatur zur spontanen Transformation gebrachte Zellen. Sie sind immortalisiert, ohne dabei Tumor-bildende Eigenschaften zu zeigen. Die Differenzierung von HaCaT-Zellen ist vergleichbar mit der primärer Keratinozyten, beispielsweise werden die Keratine 1 und 10 sowie Involukrin und Filaggrin regulär exprimiert und lokalisiert<sup>32</sup>. Dennoch ist wahrscheinlich, daß mit dem Wegfall der Proliferationsbeschränkung auch das Expressionsmuster gegenüber primären Keratinozyten deutlich verändert ist. HaCaT-Zellen proliferieren unbeschränkt und befinden sich daher in einem dauerhaften Aktivierungszustand. Auch die Stimulierung mit TNF- $\alpha$  ist möglicherweise nicht mit dem Aktivierungszustand der Keratinozyten in psoriatischen Plaques vergleichbar.

Es wurde daher die Möglichkeit untersucht, das postulierte Chemokin würde in der Dermis gebildet und sich durch Diffusion bis in die Epidermis ausbreiten.

#### **4.2.7 Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen primärer Fibroblasten**

Th1-Lymphozyten wurden sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis psoriatischer Läsionen gefunden. Würde das in dieser Arbeit gesuchte T-Zell-Chemokin von Fibroblasten gebildet, so wäre die höchste Konzentration und damit auch das Ziel einer chemotaktisch stimulierten Migration in der Dermis zu finden. Chemokine haben eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve<sup>156</sup>, was bedeutet, daß oberhalb einer gewissen Chemokinkonzentration die chemotaktisch stimulierte Migration von Zellen wieder abnimmt, weil alle Rezeptoren rund um die Zelle abgesättigt sind und ihr die Richtungsinformation verloren geht. Es bleibt dann unter Umständen eine durch das Chemokin verstärkte Migration der Zelle bestehen, aber mit

zufälliger Richtung. Wäre die Konzentration eines von Fibroblasten gebildeten Chemokins in der Dermis so hoch, daß die infiltrierten T-Zellen keine bevorzugte Richtung mehr bei ihrer Migration hätten, so könnten dennoch einige mittels Chemokinese in die Epidermis gelangen.

SAIAG *et al.*<sup>155</sup> fanden eine Hyperproliferation normaler Keratinozyten durch psoriatische Fibroblasten in einem *in vitro*-Modell für Haut. Psoriatische Fibroblasten könnten demzufolge einen eigenen Beitrag zur Erkrankung liefern. Daher wurden u. a. Kulturüberstände der Fibroblasten von Psoriasispatienten untersucht.

Die einzige schwache chemotaktische Aktivität konnte jedoch in Überständen von TNF- $\alpha$ -stimulierten Fibroblasten einer gesunden Person gefunden werden (*Tabelle 11*). Die gefundene Aktivität war bereits nach dem zweiten HPLC-Reinigungsschritt unter die Nachweisgrenze verdünnt und nach Auftrennung über eine Kationenaustausch-Säule (MonoS) nicht mehr meßbar. Die in den vorangegangenen Überlegungen für ein Vorkommen der SHL auch in der Epidermis geforderte hohe Konzentration eines Lymphozyten-Chemokins konnte eindeutig nicht bestätigt werden.

Möglich wäre auch, daß die T-Lymphozyten durch ein Chemokin stimuliert in die Dermis wanderten, aber für ihren Übergang in die Epidermis ein anderer Mechanismus verantwortlich wäre, z. B. eine direkte Zell-Zell-Interaktion. NICKOLOFF & GRIFFITHS<sup>15</sup> fanden Unterschiede zwischen dermalen und epidermalen T-Zellen psoriatischer Läsionen im Hinblick auf die Phasen ihres Zellzyklus. Mehr als 95% der dermalen T-Lymphozyten befanden sich in einem ruhenden Zustand ( $G_0$ -Phase), während dieser Anteil bei den epidermalen Zellen deutlich niedriger lag. Einige der Zellen erfuhren folglich bei oder nach ihrem Übergang in die Epidermis eine Aktivierung. Diese könnte über Zelloberflächenmoleküle im direkten Kontakt mit Keratinozyten oder anderen in den Läsionen vorhandenen Leukozyten vermittelt werden (z. B. HLA-DR<sup>+</sup>/CD1a<sup>-</sup> dendritische Zellen<sup>157,158</sup>). Auch unter dieser Annahme bietet die in den Fibroblasten-Kulturüberständen gefundene geringe chemotaktische Aktivität keine ausreichende Erklärung für die dermalen T-Zellen in den Plaques.

Wie schon bei den Keratinozyten ist auch hier nicht klar, ob die Stimulation der Fibroblasten in Kultur mit TNF- $\alpha$  physiologisch war. Immerhin konnte biologisch aktiver TNF- $\alpha$  aus psoriatischen Plaques isoliert werden<sup>159</sup>.

#### **4.2.8 Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen dendritischer Zellen**

Wichtige Komponenten des entzündlichen Infiltrats bei Psoriasis sind Monozyten in der Dermis entlang der Basalmembran<sup>14</sup> sowie dendritische Zellen (DC) in Dermis und Epidermis (vgl. *Kapitel 4.2.3*). MROWIETZ, KOCH *et al.*<sup>110</sup> fanden eine starke chemotaktische Antwort von aus Monozyten differenzierten DC (MoDC) auf C5a bzw. C5a<sub>des arg</sub> *in vitro*. C5a ist das in Psoriasis-Hautschuppen vorherrschende Chemotaxin für MoDC<sup>110</sup> und könnte daher eine wichtige Rolle für den Einstrom von DC in psoriatische Läsionen spielen.

DC in Lymphgeweben exprimierten CCL19<sup>106</sup>, das in den drei in dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen die deutlichste chemotaktische Aktivierung aller getesteten Chemokine hervorrief. Tatsächlich enthielt Kulturüberstand von MoDC als einziges der getesteten

biologischen Materialien stark positive chemotaktische Aktivität für HuT78-Zellen und schwache für PHA-stimulierte PBL (*Tabelle 12*). Diese Aktivität ging während der HPLC-Aufreinigung verloren und konnte daher nicht einer bestimmten Substanz zugeordnet werden. Es ist jedoch auszuschließen, daß es sich dabei um CCL19 handelte. Das als Positivkontrolle im Chemotaxis-Testsystem verwendete rekombinant-humane CCL19 war in gleichem Maße für PBL wie für die HuT78-Zellen chemotaktisch aktivierend, auch für OKT3-stimulierte PBL. Letztere zeigten aber mit Überständen dendritischer Zellen keine reproduzierbare chemotaktische Aktivität, auch nicht in den HPLC-Fraktionen, die mit der HuT78-Zelllinie deutliche Signale erzeugten.

Die eventuelle Bedeutung einer Th1-Chemotaxis stimulierenden Substanz aus psoriatischen DC für die Pathogenese von Psoriasis kann hier nicht ausgeschlossen werden. Würde eine solche Substanz von epidermalen DC gebildet, so hätte sie auch in den Hautschuppenextrakten positiv getestet werden müssen. Hier waren die Befunde aber fast ausschließlich negativ (vgl. *Kapitel 3.2.1* und *Tabelle 8*). Es blieben folglich dermale DC als mögliche Quelle des gesuchten T-Zell-Chemokins.

Vieles deutet auf eine Interaktion der DC mit T-Zellen vom Helfertyp 1 in psoriatischen Plaques hin<sup>16,104,132,160</sup>. Die Interaktion über direkte Zellkontakte scheint eine wichtige Rolle zu spielen. So waren epidermale DC in Psoriasisläsionen unmittelbar von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten umgeben<sup>160</sup>. Auch in der Dermis fanden sich DC in direkter Nachbarschaft von T-Zellen<sup>104</sup>. Diese DC aktivierten in vitro autologe T-Zellen zu einer Th1-Antwort (Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2). An dieser Aktivierung waren HLA-DR und LFA-1 beteiligt<sup>104</sup>, so daß hier eine Interaktion über Zellkontakte und nicht durch sezernierte Chemotaxine nachgewiesen wurde. Diese direkten Zellkontakte mit in der erkrankten Haut vorhandenen DC bieten jedoch keine Erklärung für den Einstrom von Th1-Zellen in psoriatische Plaques.

Die in Überständen von CD-Kulturen gefundenen Aktivitäten beschränkten sich fast ausschließlich auf HuT78-Zellen. Diese waren vom Autor zunächst nur für die Optimierung des chemotaktischen Testsystems gedacht. Ihre Vergleichbarkeit mit nativen Lymphozyten erscheint zweifelhaft, da mit der fehlenden Proliferationsbeschränkung ein unphysiologischer Aktivierungszustand der HuT78 wahrscheinlich ist. Die fehlende chemotaktische Aktivität von DC-Kulturüberständen für PBL weist eher daran hin, daß durch DC gebildete Chemokine für die T-Lymphozyten-Infiltrate bei Psoriasis nicht verantwortlich sind.

#### **4.2.9 Chemotaktische Aktivität in Kulturüberständen der Bronchialepithel-Zelllinie A549**

Eine herausragendes äußerliches Merkmal von Psoriasis ist die Hyperkeratose, die als übermäßige Bildung von Hautschuppen wahrgenommen wird. Diese Schuppen sind Bestandteil der hauptsächlich aus Keratinozyten gebildeten Hornzellschicht. Ein Vergleich mit hornzellfreiem Epithel erschien daher sinnvoll. Dazu wurden Zellen der Bronchialepithel-Zelllinie A549<sup>33</sup> kultiviert und mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Eine schwache Aktivierung chemotaktischer Migration von HuT78-Zellen konnte gemessen werden. Bereits nach dem zweiten HPLC-



Reinigungsschritt sank diese Aktivität unter die Nachweisgrenze. Rückschlüsse auf eine bestimmte Substanz konnten daraus nicht abgeleitet werden. Ein Vergleich mit Aktivitäten in Zellen der Haut oder in Leukozyten war nicht möglich.

Die untersuchten Extrakte und Überstände führten in keinem Fall zur Identifizierung einer bisher unbekanntem proteinartigen Komponente mit T-Zell-chemotaktischer Aktivität, noch konnte ein bereits bekanntes Chemokin nachgewiesen werden. Aufgrund der Fragestellung der vorliegenden Arbeit waren die Extrakte aus Psoriasis-Hautschuppen von besonderer Bedeutung. Um ausschließen zu können, mit den chemotaktischen Messungen eine darin enthaltenen relevanten Komponente übersehen zu haben, wurden HPLC-Fractionen aus Psoriasis-Hautschuppenextrakten auf ihre Immunreaktivität mit bereits bekannten Chemokinen getestet.

### 4.3 Immunoreaktivität in Psoriasis-Schuppenextrakten

Zum Nachweis von eventuell in den Psoriasis-Hautschuppenextrakten vorhandenem CCL19 (die Positivkontrolle in den chemotaktischen Messungen) wurden enzymgebundene Immunoassays (ELISA) durchgeführt. Experimentell weniger aufwendige „Dot-Blot“-Analysen dienten der immunologischen Suche nach einer Reihe weiterer, bereits bekannter Chemokine. Hierzu gehörten neben CCL19 die zuvor auf chemotaktische Wirksamkeit getesteten Substanzen CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$  und CCL17. Eine mögliche Relevanz dieser fünf Chemokine für die T-Zell-Chemotaxis bei Psoriasis wurde in *Kapitel 4.1.3* diskutiert. Ebenfalls mit Hilfe von „Dot-Blot“-Analysen getestete Chemokine waren CXCL11, CXCL9, CCL20, CCL18, CCL21, CCL25, CX<sub>3</sub>CL1 sowie XCL1. Ihre Bedeutung für die T-Zell-Chemotaxis wird im folgenden kurz dargelegt. Danach werden die Ergebnisse der immunochemischen Tests diskutiert.

*CXCL11* ist ein CXC-Chemokin und bindet an den CXC-Rezeptor 3<sup>24</sup>. Es zeigte deutliche chemotaktische Aktivierung von IL-2-stimulierten T-Zellen, nicht aber von frisch isolierten, unstimulierten T-Lymphozyten<sup>24</sup>. Sein Rezeptor CXCR3<sup>86</sup> findet sich auf den meisten T-Gedächtniszellen des peripheren Blutes und wird in TH1-Lymphozyten stärker exprimiert als in Th2-Zellen<sup>161</sup>.

*CXCL9* gehört ebenso zu den CXC-Chemokinen<sup>162</sup>. Es wird in der oberen Dermis psoriatischer Läsionen stark exprimiert<sup>162</sup>. Es bindet an den gleichen Rezeptor wie CXCL11, nämlich CXCR3 und wird daher ebenso von T-Gedächtniszellen des peripheren Blutes erkannt.

*CCL20* ist ein CC-Chemokin und bindet an den CC-Rezeptor 6<sup>23</sup>. Es war in der Lage, in einem Modellsystem für Blutgefäße CD4+ T-Gedächtniszellen zum Anheften an eine Oberfläche zu bringen<sup>18</sup>. *In vivo* entspräche dies dem „Rollen“ dieser T-Lymphozyten an Blutepithelzellen entlang, einem notwendigen Schritt zum Einwandern dieser Zellen aus dem Blut in das Gewebe (vgl. *Kapitel 4.2.2*). CCL20 wurde als Chemokin für Lymphozyten und dendritische Zellen beschrieben<sup>163</sup>. HOMEY *et al.*<sup>164</sup> zeigten die Expression von CCL20 in mit T-Zellen benachbarten

Keratinocyten psoriatischer Läsionen. Große Mengen des CCL20-Rezeptors CCR6 wurden auf T-Lymphozyten aus psoriatischer Haut exprimiert.

*CCL18* gehört auch zu den CC-Chemokinen<sup>99</sup>. Es wird von dendritischen Zellen exprimiert, besonders in den Bereichen sekundärer lymphatischer Organe. *CCL18* wirkt chemotaktisch aktivierend auf ruhende  $CD45RA^+$  T-Zellen<sup>165</sup>.

*CCL21* ist ein CC-Chemokin<sup>99</sup> und bindet wie *CCL19* an den CC-Rezeptor  $7^{66}$ . Es wird besonders in den T-Zell-Arealen lymphatischen Gewebes exprimiert<sup>66</sup> und ist chemotaktisch aktivierend sowohl für ruhende ( $CD45R0^-$ ) T-Lymphozyten als auch für T-Gedächtniszellen ( $CD45R0^+$ ) sowie für frisch isolierte B-Lymphozyten<sup>166</sup>.

*CCL25* ist ein CC-Chemokin. Sein Rezeptor  $CCR9^{167}$  wird von  $CD4^+CD8^+$  Lymphozyten im Thymus sowie von  $CD8^+$  Lymphozyten in der Milz und in Lymphknoten exprimiert<sup>168</sup>.

*XCL1* ist ein C-Chemokin<sup>86</sup> und bindet an XC-Rezeptor  $1^{169}$ . Es wurde in aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen exprimiert und war chemotaktisch für Lymphozyten<sup>84</sup>.

*CX<sub>3</sub>CL1* ist ein  $CX_3C$ -Chemokin und bindet an den  $CX_3C$ -Rezeptor  $1^{85}$ . Es kann in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen, verankert in Membranen oder in löslicher Form. Die lösliche Variante gilt als potentes Chemokin für T-Zellen. Eine hohe Expression von *CX<sub>3</sub>CL1* wurde bei dermalen DC psoriatischer Plaques beobachtet<sup>170</sup>.

Die Ergebnisse der ELISA mit Kaninchen-Antikörpern gegen *CCL19* zeigten eine Immunoreaktivität in Präparation C von Psoriasis-Hautschuppenextrakten (*Abbildung 10 A* und *B*). Ein Vorhandensein von *CCL19* in den positiven Fraktionen konnte jedoch weder in einer SDS-PAGE (*Abbildung 11*) noch in einem „Western-Blot“ (*Abbildung 12*) bestätigt werden. Folglich mußte von einer nicht Antigen-spezifischen Bindung des anti-*CCL19*-Antikörpers an eine in den HPLC-Fraktionen enthaltene Komponente ausgegangen werden. Der ELISA mit Kaninchen-Normalserum bestätigte diesen Befund (*Abbildung 10 C*). Normalserum bindet nicht spezifisch an ein bestimmtes Protein, zeigte hier aber eine mit dem anti-*CCL19*-Antikörper vergleichbare Verteilung der Immunoreaktivität. Aus dem Chromatogramm der HPLC-Auftrennung war in diesem Bereich ein leichter Anstieg der optischen Dichte in den später eluierenden Fraktionen zu erkennen (*Abbildung 10 A* im Bereich des grauen Rechtecks). Folglich entsprach die Verteilung der gemessenen Immunoreaktivität nicht der Menge des in den jeweiligen Fraktionen vorhandenen Gesamtproteins. Dies ließ auf eine Substanz besonders in den Fraktionen 16 und 18 schließen, die an eine bei allen verwendeten Kaninchen-Antikörpern identische Domäne bindet. *CCL19* war in den Fraktionen 14 bis 21 nicht in ausreichender Menge vorhanden, um in der SDS-PAGE sichtbar zu sein. In allen übrigen Fraktionen lag es unterhalb der Nachweisgrenze für ELISA.

In den „Dot-Blot“-Analysen wurde schwache Immunoreaktivität für Antikörper gegen *CCL2*, *CXCL12 $\alpha$* , *CXCL12 $\beta$*  sowie *CCL17* bei Verwendung der „Pure Nitrocellulose“-Membran gefunden (*Tabelle 14*). Hierbei ergaben sich jedoch erhebliche Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Selbst in dem Test mit der deutlichsten Lumineszenz

(CCL17, *Abbildung 13*) ergaben sich deutliche Unterschiede bei mehrfachem Auftragen derselben Fraktionen. Zwar waren die Fraktionen 15 bis 18 in beiden Fällen übereinstimmend positiv, Fraktion 22 sowie die Positivkontrolle zeigten jedoch nur in der unteren Hälfte der Membran Lumineszenz, während Fraktion 7 dies nur in der oberen Hälfte tat. Mit Antikörpern gegen CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$  und CX<sub>3</sub>CL1 konnte für die rekombinant-humanen Chemokine als Positivkontrollen keine Immunreaktivität festgestellt werden (*Tabelle 14*). Die positiven Signale in den Fraktionen scheinen daher eher auf nicht Antigen-spezifische Bindungen der Antikörper an in den Fraktionen enthaltene Proteine zurückzuführen sein.

Bei Verwendung der ImmobilonP-Membran ergaben sich mit ansonsten identischen Parametern deutlich erkennbare und reproduzierbare Unterschiede zwischen den Positiv- und den Negativkontrollen (als Beispiel anti-CXCL12 $\alpha$ -Antikörper, *Abbildung 14*). In den Fraktionen der HPLC wurde mit keinem der getesteten Antikörper und dieser Membran Immunreaktivität gemessen. Die Chemokine CCL2, CXCL12 $\alpha$ , CXCL11, CXCL9, CCL20, CCL18, CCL21, CCL25, CX<sub>3</sub>CL1 und XCL1 waren folglich nicht oder in einer unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Konzentration im Psoriasis-Schuppenextrakt vorhanden. Da die Antikörper gegen CCL19, CXCL12 $\beta$  und CCL17 mit den rekombinant-humanen Positivkontrollen keine Immunreaktivität zeigten, kann aus den „Dot-Blot“-Analysen über ihr Vorhandensein keine Aussage gemacht werden. Das Fehlen von CCL19 in dem Schuppenextrakt C ist bereits durch die vorangegangenen Tests bewiesen worden.

Die immunochemischen Ergebnisse verleihen der aus den chemotaktischen Untersuchungen abgeleiteten Aussage über das Fehlen einer Lymphozyten-chemotaktischen, proteinartigen Substanz in Psoriasis-Hautschuppen zusätzliche Sicherheit. Neueren Untersuchungen zufolge sind eine Reihe weiterer Substanzen bekannt, die bei der Infiltration von Th1-Lymphozyten in die Dermis und Epidermis psoriatischer Läsionen eine Rolle spielen könnten (z. B. CCL27 (CTACK)<sup>171</sup>). Endgültige Sicherheit in dieser Frage kann es erst durch Aufklärung des tatsächlich zugrunde liegenden Mechanismus geben.

#### 4.4 Fazit und Ausblick

Weitgehende Einigkeit herrscht in der Literatur darüber, daß T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von *Psoriasis vulgaris* spielen. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil des entzündlichen Infiltrats in den erkrankten Hautregionen. Die genauen Ursachen für ihr Einwandern aus dem Blut in die Dermis und Epidermis im Bereich psoriatischer Läsionen sind jedoch nicht geklärt.

Ein Assaysystem wurde erfolgreich optimiert, das der simultanen Testung einer großen Anzahl von Proben auf darin enthaltene Lymphozyten-chemotaktische Substanzen diene. Die Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle waren sehr deutlich erkennbar und die Ergebnisse konnten reproduziert werden. Die Wahl des eingesetzten Probenmaterials sowie die

Zusammensetzung der Testzellen sind bei diesem Testsystem variabel. Damit steht auch für weitere Fragestellungen auf diesem Gebiet eine leistungsfähige Methode zur Verfügung.

Mit Hilfe dieses Testsystems wurden eine ganze Reihe von biologischen Materialien untersucht. Vier verschiedene Extrakte aus Psoriasis-Hautschuppen enthielten praktisch keine chemotaktische Aktivität für die eingesetzten Testzellen. Auch die immunochemischen Untersuchungen eines der Extrakte erbrachten keinen Nachweis von im Hautschuppenmaterial vorhandenen, bereits bekannten Chemokinen.

Aufgrund dieser Ergebnisse muß die Fragestellung negativ beantwortet werden. In Psoriasis-Hautschuppen befindet sich keine ausreichende Menge einer chemotaktisch wirksamen, proteinartigen Substanz, die eine Erklärung für das Einwandern von T-Lymphozyten in psoriatische Plaques liefern würde.

Eine Reihe von Ursachen für diesen Befund sind denkbar. Die chemische Instabilität einer solchen Substanz könnte schon während der Entstehung der Hautschuppen zu einer chemotaktischen Inaktivierung führen. Hier wäre „frische“, erkrankte Haut die beste Alternative zu dem abgestorbenen Schuppenmaterial. Eine mögliche Quelle dieser Haut in für die Aufreinigung ausreichender Menge ist dem Autor jedoch nicht bekannt.

Eine andere chemische Beschaffenheit als die eines Proteins oder Polypeptids hätte zum Verlust der gesuchten Substanz in der Extraktion geführt. Hier wären weitere Untersuchungen z. B. zu den in der erkrankten Haut vorhandenen Lipiden von Interesse (vgl. *Kapitel 4.2.4*). Diese könnten analog zur Methodik der vorliegenden Arbeit in einem chemotaktischen Assaysystem mit Lymphozyten getestet werden.

Die gesuchte Substanz könnte *in vivo* an Zelloberflächen gebunden sein (vgl. Bindung von Chemokinen an Heparansulfat-Proteoglykane, *Kapitel 4.2.2*) und eine chemotaktische Wirkung für Lymphozyten nur während dieser Bindung aufweisen. Für diesen Fall wäre ein *in vitro*-Modell der menschlichen Haut denkbar, in dem die am Ort des Erkrankungsgeschehens vorhandenen Zellen auf ihre Interaktion miteinander getestet würden. Entlang einer künstlichen extrazellulären Matrix (der „Basallamina“) könnten primäre Keratinozyten und Fibroblasten kultiviert werden. Durch Zugabe bestimmter Populationen von Leukozyten von gesunden oder erkrankten Spender, aus normaler oder befallener Haut, mit verschiedenen Zytokinen stimuliert oder unstimuliert, könnten die krankungsfördernden Komponenten eingegrenzt und schließlich identifiziert werden.

Das gesuchte Chemotaxin in psoriatischen Läsionen könnte auf die Dermis beschränkt sein. Dann wäre es in den aus der Epidermis hervorgegangenen Hautschuppen nicht nachweisbar. Ein Teil der T-Lymphozyten würde möglicherweise durch zufällige Migration oder direkte Zell-Zell-Interaktion in die Epidermis gelangen. Auch in diesem Fall wäre ein Nachweis in frisch entnommener, befallener Haut oder in dem beschriebenen Modell künstlicher Haut denkbar.

Neuere Befunde zeigten Unterschiede zwischen den exprimierten Rezeptoren auf T-Lymphozyten aus psoriatischen Plaques und denen auf T-Zellen des peripheren Blutes<sup>154</sup>.

Daher müßte für künftige Experimente ein Weg gefunden werden, T-Zellen aus dem peripheren Blut zur Expression der selben Rezeptoren zu bringen, die auf den psoriatischen T-Lymphozyten gefunden wurden. Als Testzellen in dem hier verwendeten chemotaktischen Assaysystem könnten diese Lymphozyten so möglicherweise zu einer Identifikation des gesuchten Chemokins in Psoriasis-Hautschuppen führen.

Die Untersuchung von Kulturüberständen in der Haut vorkommender Zellen brachte keine Erkenntnisse über das postulierte Chemokin. Die in Überständen von aus Monozyten differenzierten dendritischen Zellen gefundenen chemotaktischen Aktivitäten waren für eine Aufreinigung der aktiven Substanz nicht ausreichend. Insbesondere wurde praktisch keine Aktivität mit nativen Lymphozyten als Testzellen ermittelt. Dennoch sind nach Auffassung des Autors DC eine mögliche Quelle der gesuchten Komponente bei Psoriasis. Hier spielen aber eventuell eine Reihe komplexer Interaktionen mit anderen Zellpopulationen, Zytokinen und Oberflächenmolekülen *in situ* eine Rolle, die sich in einer einfachen Zellkultur nicht genügend nachbilden ließen. Auch hier wäre die „künstliche Haut“ ein möglicher Lösungsansatz.

Weitere wichtige Erkenntnisse werden detailliertere Untersuchungen der auf den infiltrierenden Leukozyten exprimierten Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle bringen. Genauere Analysen zur Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats sowie die Identifikation weiterer Lymphozytenchemokine werden wichtige Anhaltspunkte für die Pathogenese von *Psoriasis vulgaris* bieten. Diese Erkenntnisse werden auch für die Aufklärung anderer chronisch-entzündlicher Erkrankungen der Haut (z. B. atopische Dermatitis) oder anderer Organe (z. B. *Morbus CROHN*) hilfreich sein. Darüber hinaus verhilft die Erforschung der pathogenen Mechanismen auch zu einem komplexeren Verständnis der gesunden Systeme in den Organismen.

## 5 Zusammenfassung

*Psoriasis vulgaris* ist eine Erkrankung des Menschen, die in Form schuppender Herde der Haut in Erscheinung tritt. Diese sind die Folge einer lokal stark erhöhten Proliferation von Keratinozyten in Verbindung mit ihrer mangelnden Differenzierung zu Hornzellen. In der erkrankten Haut finden sich eine Reihe von Entzündungszellen, die im Verdacht stehen, über Mediatoren oder direkte Zellkontakte mit den Keratinozyten den beschriebenen Phänotyp zu verursachen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Leukozyten sind Th1-Lymphozyten. Ihre große Bedeutung für die Pathogenese von Psoriasis ist unbestritten. Unklar ist, welche Faktoren für das Einwandern dieser Zellen aus dem Blut in die erkrankte Haut entscheidend sind.

Die in der vorliegenden Arbeit formulierte Hypothese geht dabei von einem Chemokin aus, welches in hoher Konzentration in der erkrankten Haut gebildet wird und das ursächlich für eine chemotaktisch stimulierte Migration der Th1-Zellen in Dermis und Epidermis ist.

Zum Nachweis dieses Chemokins wurden Extrakte von Psoriasis-Hautschuppen mit Hilfe der Hochdurchsatz-Flüssigchromatographie (HPLC) aufgetrennt. Die entstandenen Fraktionen wurden auf ihre chemotaktische Aktivität für Lymphozyten hin untersucht. Als Vergleichsmaterial zu den Hautschuppen diente Fersenkallus gesunder Probanden. Zur Aufklärung möglicher Quellen des gesuchten Chemokins in der Haut wurden Keratinozyten sowie die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, Fibroblasten sowie dendritischen Zellen kultiviert und deren Überstände mit in die Analysen einbezogen. Als Beispiel für ein hornzellularfreies Epithel dienten Zellen der Bronchialepithel-Zelllinie A549. Als Testzellen in der Chemotaxis fanden die Zelllinie HuT78, mit anti-CD3-Antikörpern aktivierte periphere Blutlymphozyten (PBL) sowie IL-2-aktivierte Th1-Lymphozyten Verwendung.

Zum Nachweis möglicherweise in den Läsionen vorhandener, bereits bekannter Chemokine wurde Psoriasis-Hautschuppenextrakt immunochemisch untersucht.

Die der Literatur entnommenen Parameter für chemotaktische Tests in einer BOYDEN-Multikammer führten mit Lymphozyten nicht zu der erforderlichen Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Daher wurde das Chemotaxis-Assaysystem zu Beginn der Untersuchungen optimiert, so daß eine große Anzahl von Proben gleichzeitig getestet werden konnte. Als am besten geeignete Positivkontrolle erwies sich CCL19.

In den Extrakten aus Psoriasis-Hautschuppen wurde keine chemotaktische Aktivität für die nativen Testzellen gefunden. Mit der Zelllinie HuT78 waren Fraktionen aus zwei Präparationen positiv. Diese Aktivität sank nach der zweiten HPLC-Auftrennung unter die Nachweisgrenze.

In den Kulturüberständen von Hautzellen und dendritischen Zellen fanden sich zum Teil starke chemotaktische Aktivitäten, die jedoch in der weiteren HPLC-Auftrennung unter die Nachweisgrenze sanken. Diese starken chemotaktischen Aktivitäten waren auf die Zelllinie HuT78 als Testzellen beschränkt. Mit nativen Lymphozyten wurden deutlich schwächere

Aktivitäten u. a. in den Überständen dendritischer Zellen gefunden. In keinem Fall genügte die vorhandene Menge der aktivierenden Substanz, um diese charakterisieren zu können.

Bei den immunochemischen Untersuchungen zeigte sich, daß in den untersuchten Psoriasis-Hautschuppenextrakten die Chemokine CCL2, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CXCL9, CXCL11, CXCL12 $\alpha$ , CX<sub>3</sub>CL1 und XCL1 nicht nachweisbar waren.

In Psoriasis-Hautschuppen war kein Protein oder Polypeptid nachweisbar, welches in ausreichender Menge vorgelegen hätte, um einen Einstrom von Th1-Lymphozyten in die Haut psoriatischer Läsionen erklären zu können. Eine Reihe von Ursachen für diesen Befund sind denkbar: 1) der gesuchte Lockstoff könnte ein Lipid sein; 2) er könnte chemisch instabil sein; 3) fänden die Th1-Zellen haptotaktisch über an Oberflächen gebundene Moleküle ihren Weg in die Haut, so wäre die verantwortliche Substanz in extrahierter Form möglicherweise inaktiv; 4) die gesuchte Substanz könnte auf die Dermis erkrankter Hautregionen beschränkt sein und die in der Epidermis gefundenen T-Zellen gelangten mittels Chemokinese anstatt durch Chemotaxis dort hin; 5) stimulierten zusätzlich *in situ* vorhandene Mediatoren die T-Lymphozyten, besondere Rezeptoren zu exprimieren, so könnten diese bei den Testzellen fehlen.

Genauere Untersuchungen zur Rezeptorexpression der T-Zellen in psoriatischen Plaques werden helfen, diese Fragen zu klären. Modelle künstlicher Haut könnten dem Nachweis komplexer Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen der Haut und des Immunsystems dienen. Erkenntnisse zur Pathogenese von Psoriasis werden sich teilweise auch auf andere chronisch entzündliche Erkrankungen übertragen lassen.

## 6 Summary

*Psoriasis vulgaris* is a human disease that manifests itself as a skin phenotype with erythematous scaling plaques. These plaques result from an over-proliferation of keratinocytes combined with their incomplete differentiation into corneocytes. Numerous inflammatory cells can be identified in affected skin. These are thought to generate the above mentioned keratinocyte characteristics either *via* mediators or direct cell-cell contact. A large proportion of the leukocytes in psoriatic skin are Th1-lymphocytes. Their importance in the pathogenesis of psoriasis is undoubted. Nevertheless it remains unclear, which factors are responsible for stimulating the migration of these cells from the blood into the skin.

Previous work has led to the hypothesis that a chemokine, produced in high concentration in affected skin, causes the stimulated chemotactic migration of Th1-cells into the dermis and epidermis.

In order to identify this chemokine, extracts from psoriatic scales were separated using high performance liquid chromatography (HPLC). The resulting fractions were tested for their ability to stimulate chemotactic activity in lymphocytes. Callus material from the heels of healthy donors was used for comparison with the psoriatic scales. In order to identify the source of the putative chemokine in the skin, keratinocytes, the keratinocyte cell line HaCaT, fibroblasts and dendritic cells were cultured and their supernatants were analysed. The lung epithelial cell line A549 was used as an example of an epithelium that is free of horn cells. In the chemotaxis assays, the T-cell line HuT78, peripheral blood lymphocytes activated with anti-CD3-antibody and IL-2-activated Th1-lymphocytes were utilized as test cells.

To check for known chemokines in the lesional skin, psoriatic scale extract was analysed using immunochemical methods.

The parameters for chemotaxis tests using a BOYDEN-multichamber, as described in the existing literature, did not lead to reproducible results when lymphocytes were used as test cells. Therefore the chemotaxis assay was optimized at the start of the study, thus enabling the simultaneous testing of many HPLC fractions. CCL19 turned out to be the most suitable positive control.

In the psoriasis scale extracts no chemotactic activity was found with native test cells. Fractions of two preparations were positive with HuT78 cells. However, the activity of both preparations decreased following further HPLC separations and was no longer detectable after two rounds of HPLC.

In supernatants from keratinocytes, fibroblasts and dendritic cells chemotactic activities were detected using HuT78 test cells. Again, this activity decreased below the level of detection after a few HPLC separations. With native lymphocytes only weak activity was detected. None of the purifications lead to a sufficient amount of active substance for subsequent analysis.



---

In the immunochemical tests not one of the chemokines CCL2, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CXCL9, CXCL11, CXCL12 $\alpha$ , CX<sub>3</sub>CL1 or XCL1 was detectable in psoriasis scale extracts.

In psoriasis scale material no protein or polypeptide could be found in sufficient amounts to explain the infiltration of Th1-lymphocytes into psoriatic lesions of the skin. There may be a number of explanations for this result: 1) the sought after attractant could be a lipid; 2) it could be chemically unstable; 3) if Th1-cell migration into skin is a haptotactic process, utilizing surface-bound molecules, then these mediators may be chemotactically inactive after being extracted; 4) the putative attractant could be limited to the dermal layer of the skin with T-cells entering the epidermis by random migration; 5) additional mediators occurring *in situ* might stimulate T-lymphocytes to express receptors that were consequently missing on the test cells.

Further analysis of receptor expression in T-cells from psoriatic plaques will help to answer these open questions. Artificial skin models could help in elucidating complex interactions between different cell types of the skin and the immune system. Knowledge about the pathogenesis of psoriasis will, in part, be applicable to other chronic inflammatory diseases.

## 7 Literaturverzeichnis, sortiert nach Indexnummern

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 1-12 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2002).
2. Finlay AY, Coles EC. The effect of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients. *Br J Dermatol* 132, 236-244 (1995).
3. McKay IA, Leigh IM. Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 105-114 (1995).
4. Creamer D, Allen MH, Sousa A, Poston R, Barker JN. Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 136, 859-865 (1997).
5. Barker JN. Pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 25, 778-781 (1998).
6. Geras AJ. 127-129 (Sandoz Pharma Press, Basel, 1990).
7. Fritsch P. 335-345 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998).
8. Ameen M, Allen MH, Fisher SA, Lewis CM, Cuthbert A, Kondeatis E, Vaughan RW, Murakami H, Nakagawa H, Barker JN. Corneodesmosin (CDSN) gene association with psoriasis vulgaris in Caucasian but not in Japanese populations. *Clin Exp Dermatol* 30, 414-418 (2005).
9. Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE, Westphal E, Voorhees JJ, Christophers E, Kronke M. Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 54, 439-449 (1999).
10. Christophers E, Mrowietz U. The inflammatory infiltrate in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 131-135 (1995).
11. Christophers E, Parzefall R, Braun-Falco O. Initial events in psoriasis: quantitative assessment. *Br J Dermatol* 89, 327-334 (1973).
12. Schubert C, Christophers E. Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis. *Arch Dermatol Res* 277, 352-358 (1985).
13. Boehncke WH, Wortmann S, Kaufmann R, Mielke V, Sterry W. A subset of macrophages located along the basement membrane ("lining cells") is a characteristic histopathological feature of psoriasis. *Am J Dermatopathol* 17, 139-144 (1995).
14. van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C. Epithelium-lining macrophages in psoriasis. *Br J Dermatol* 130, 589-594 (1994).
15. Nickoloff BJ, Griffiths CE. Lymphocyte trafficking in psoriasis: a new perspective emphasizing the dermal dendrocyte with active dermal recruitment mediated via endothelial cells followed by intra-epidermal T-cell activation. *J Invest Dermatol* 95, 35S-37S (1990).
16. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 121, 421-431 (1989).
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1254-1261 (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).
18. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384 (1998).

19. Smith CH, Barker JN. Cell trafficking and role of adhesion molecules in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 151-160 (1995).
20. Griffiths CE, Voorhees JJ. Psoriasis, T cells and autoimmunity. *J R Soc Med* 89, 315-319 (1996).
21. Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98, 1878-1887 (1996).
22. Prens E, Debets R, Hegmans J. T lymphocytes in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 115-129 (1995).
23. Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiya H, Yoshie O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 272, 14893-14898 (1997).
24. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-2021 (1998).
25. Pleass R, Camp R. Cytokines induce lymphocyte migration in vitro by direct, receptor-specific mechanisms. *Eur J Immunol* 24, 273-276 (1994).
26. Mrowietz U, Jürgens G. A method for the determination of leukocyte migration for large sample numbers by automated densitometric quantification. *J Biochem Biophys Methods* 30, 49-58 (1995).
27. Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC. Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154, 1403-1418 (1981).
28. Zheng M, Yang H, Mrowietz U. Isolation of human monocyte subpopulations by single-step counterflow centrifugation elutriation using a Sanderson chamber. Phenotypical and functional characterization of isolated cells. *Clin Biotechnol* 3, 197-201 (1991).
29. Taub DD, Key ML, Clark D, Turcovski-Corrales SM. Chemotaxis of T lymphocytes on extracellular matrix proteins. Analysis of the in vitro method to quantitate chemotaxis of human T cells. *J Immunol Methods* 184, 187-198 (1995).
30. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134 (1998).
31. Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137, 387-410 (1973).
32. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771 (1988).
33. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423 (1973).
34. Irvine GB, Shaw C. High-performance gel permeation chromatography of proteins and peptides on columns of TSK-G2000-SW and TSK-G3000-SW: a volatile solvent giving separation based on charge and size of polypeptides. *Anal Biochem* 155, 141-148 (1986).
35. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379 (1987).
36. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32 (1988).

37. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354 (1979).
38. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466 (1962).
39. Schröder JM. Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol* 288, 266-297 (1997).
40. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1133 (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).
41. Snyderman R, Goetzl EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213, 830-837 (1981).
42. Wilkinson P. 63 (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982).
43. Wilkinson P. 105 (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982).
44. Snyderman R, Altman LC, Hausman MS, Mergenhagen SE. Human mononuclear leukocyte chemotaxis: a quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J Immunol* 108, 857-860 (1972).
45. Ternowitz T. Human monocyte and neutrophil chemotaxis in vitro employing <sup>51</sup>Cr-labelled leukocytes. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 93, 189-193 (1985).
46. Mrowietz U, Ternowitz T. Monocyte chemotaxis: a method for routine in vitro investigation using lactic dehydrogenase as a marker enzyme. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 95, 1-7 (1987).
47. Falk W, Goodwin RH, Jr., Leonard EJ. A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods* 33, 239-247 (1980).
48. Wilkinson PC. Lymphocyte locomotion "in vitro": the role of growth activators and chemoattractants. *Biomed Pharmacother* 41, 329-336 (1987).
49. Lewis WH. Locomotion of lymphocytes. *Bull Johns Hopkins Hosp* 49, 29 ff. (1931).
50. McCutcheon M. Studies on the locomotion of leucocytes. III. The normal rate of locomotion of human lymphocytes *in vitro*. *Amer J Physiol* 69, 279 ff. (1924).
51. Russell RJ, Wilkinson PC, Sless F, Parrott DM. Chemotaxis of lymphoblasts. *Nature* 256, 646-648 (1975).
52. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 271, 21514-21521 (1996).
53. Zheng M, Sun G, Mrowietz U. The chemotactic activity of T-lymphocytes in response to interleukin 8 is significantly decreased in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 5, 334-340 (1996).
54. Bacon KB, Camp RD, Cunningham FM, Woollard PM. Contrasting in vitro lymphocyte chemotactic activity of the hydroxyl enantiomers of 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *Br J Pharmacol* 95, 966-974 (1988).
55. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358 (1993).
56. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177, 1809-1814 (1993).
57. Davis JM, St John J, Cheung HT. Haptotactic activity of fibronectin on lymphocyte migration in vitro. *Cell Immunol* 129, 67-79 (1990).

58. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-237 (1994).
59. Zachariae CO. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 181, 1-37 (1993).
60. Zachariae CO, Kaltoft K, Thestrup-Pedersen K. Human T lymphocytes and T-cell lines as target cells for lymphocyte chemotaxis. *Arch Dermatol Res* 284, 77-81 (1992).
61. McGregor DD, Logie PS. The mediator of cellular immunity. VII. Localization of sensitized lymphocytes in inflammatory exudates. *J Exp Med* 139, 1415-1430 (1974).
62. Cole D, Van Epps DE, Williams RC, Jr. Defective T-lymphocyte chemotactic factor production in patients with established malignancy. *Clin Immunol Immunopathol* 38, 209-221 (1986).
63. Keller HU, Naef A, Zimmermann A. Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res* 153, 173-185 (1984).
64. Kornfeld H, Berman JS, Beer DJ, Center DM. Induction of human T lymphocyte motility by interleukin 2. *J Immunol* 134, 3887-3890 (1985).
65. Franitza S, Alon R, Lider O. Real-time analysis of integrin-mediated chemotactic migration of T lymphocytes within 3-D extracellular matrix-like gels. *J Immunol Methods* 225, 9-25 (1999).
66. Willmann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28, 2025-2034 (1998).
67. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1925-1930 (1997).
68. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184, 569-577 (1996).
69. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 164, 3368-3376 (2000).
70. Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* 162, 186-194 (1999).
71. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 272, 13803-13809 (1997).
72. Jutel M, Wyss-Coray T, Carballido JM, Blaser K, Muller UR, Pichler WJ. Selective restimulation of antigen or allergen preactivated T cells using OKT3 F(ab)2 results in the secretion of TH-1 or TH-2-like cytokine patterns. *Clin Exp Allergy* 25, 1108-1117 (1995).
73. Verwilghen J, Baroja ML, Van Vaeck F, Van Damme J, Ceuppens JL. Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunology* 72, 269-276 (1991).
74. Bottazzi B, Introna M, Allavena P, Villa A, Mantovani A. In vitro migration of human large granular lymphocytes. *J Immunol* 134, 2316-2321 (1985).
75. Baker BS, Bokth S, Powles A, Garioch JJ, Lewis H, Valdimarsson H, Fry L. Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 128, 493-499 (1993).

76. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102, 145-149 (1994).
77. Selvan RS, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of IL-2, IL-4 and IL-6 in the growth and differentiation of tumor-specific CD4+ T helper and CD8+ T cytotoxic cells. *Int J Cancer* 45, 1096-1104 (1990).
78. Wustrow TP. Interactions and biological mechanisms of action of molecular signal peptides. II. Interleukin 2 (IL-2). *Hno* 39, 323-331 (1991).
79. Mrowietz U, Ternowitz T, Schroder JM, Christophers E. Recombinant human tumour necrosis factor beta (lymphotoxin) lacks chemotactic activity for human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Scand J Immunol* 30, 373-377 (1989).
80. Ternowitz T, Thestrup-Pedersen K. Epidermis and lymphocyte interactions during a tuberculin skin reaction. II. Epidermis contains specific lymphocyte chemotactic factors. *J Invest Dermatol* 87, 613-616 (1986).
81. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173 (1989).
82. Schröder JM. Inflammatory mediators and chemoattractants. *Clin Dermatol* 13, 137-150 (1995).
83. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179 (1994).
84. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399 (1994).
85. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640-644 (1997).
86. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445 (1998).
87. Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95, 1370-1376 (1995).
88. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Faseb J* 8, 1055-1060 (1994).
89. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-3656 (1994).
90. Bunn PA, Jr., Foss FM. T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem Suppl* 24, 12-23 (1996).
91. Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriya K, Nishioka K, Katayama I. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Dermatol* 138, 63-70 (1998).
92. Taub DD, Lloyd AR, Wang JM, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol* 351, 139-146 (1993).
93. Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J, Wang JM. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* 255, 67-73 (1998).

94. Swensson O, Schubert C, Christophers E, Schroder JM. Inflammatory properties of neutrophil-activating protein-1/interleukin 8 (NAP-1/IL-8) in human skin: a light- and electronmicroscopic study. *J Invest Dermatol* 96, 682-689 (1991).
95. Kim CH, Pelus LM, White JR, Applebaum E, Johanson K, Broxmeyer HE. CK beta-11/macrophage inflammatory protein-3 beta/EBI1-ligand chemokine is an efficacious chemoattractant for T and B cells. *J Immunol* 160, 2418-2424 (1998).
96. Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272, 15036-15042 (1997).
97. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883 (1998).
98. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109 (1996).
99. Yoshie O, Imai T, Nomiya H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 62, 634-644 (1997).
100. Gillitzer R, Wolff K, Tong D, Muller C, Yoshimura T, Hartmann AA, Stingl G, Berger R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* 101, 127-131 (1993).
101. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM, Schall TJ, Ruff MR, Pert CB. Upregulation of RANTES in psoriatic keratinocytes: a possible pathogenic mechanism for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 79, 9-11 (1999).
102. Placek W, Haftek M, Thivolet J. Sequence of changes in psoriatic epidermis. Immunocompetent cell redistribution precedes altered expression of keratinocyte differentiation markers. *Acta Derm Venereol* 68, 369-377 (1988).
103. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: A disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7, 256-259 (1986).
104. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94, 202-209 (1994).
105. Tse H, Rosenthal A. in *Inflammation: basic principles and clinical correlates* 631-649 (Raven Press, LTD, New York, 1988).
106. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 188, 181-191 (1998).
107. Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284, 819-822 (1999).
108. Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 139, 3474-3483 (1987).
109. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9, 617-648 (1991).
110. Mrowietz U, Koch WA, Zhu K, Wiedow O, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Psoriasis scales contain C5a as the predominant chemotaxin for monocyte-derived dendritic cells. *Exp Dermatol* 10, 238-245 (2001).
111. Schröder JM, Christophers E. Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales. *J Invest Dermatol* 87, 53-58 (1986).

112. Takematsu H, Tagami H. Quantification of chemotactic peptides (C5a anaphylatoxin and IL-8) in psoriatic lesional skin. *Arch Dermatol* 129, 74-80 (1993).
113. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99 (1989).
114. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343, 757-760 (1990).
115. Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 264, 9053-9060 (1989).
116. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9238-9242 (1987).
117. Messadi DV, Pober JS, Fiers W, Gimbrone MA, Jr., Murphy GF. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 139, 1557-1562 (1987).
118. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165 (1989).
119. Toothill VJ, Van Mourik JA, Niewenhuis HK, Metzelaar MJ, Pearson JD. Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *J Immunol* 145, 283-291 (1990).
120. Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JN. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 10, 280-285 (2001).
121. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361, 79-82 (1993).
122. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64 (1989).
123. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933 (1988).
124. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996).
125. Lawrence MB, Berg EL, Butcher EC, Springer TA. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. *Eur J Immunol* 25, 1025-1031 (1995).
126. Hammar H, Gu SQ, Johannesson A, Sundkvist KG, Biberfeld P. Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesion. *J Invest Dermatol* 83, 416-420 (1984).
127. Nikaein A, Morris L, Phillips C, Soliman M, Ordonez G, Silverman A, Stone MJ, Menter A. Characterization of T-cell clones generated from skin of patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 28, 551-557 (1993).
128. Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24, 2377-2382 (1994).
129. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6367-6371 (1989).



130. Yoshizaki K, Nishimoto N, Matsumoto K, Tagoh H, Taga T, Deguchi Y, Kuritani T, Hirano T, Hashimoto K, Okada N, et al. Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes. *Cytokine* 2, 381-387 (1990).
131. Krueger GG, Jorgensen C, Miller C, et al. Effects of IL-8 on epidermal proliferation. *J Invest Dermatol* 94, 545 (1990).
132. McGregor JM, Barker JN, Ross EL, MacDonald DM. Epidermal dendritic cells in psoriasis possess a phenotype associated with antigen presentation: in situ expression of beta 2-integrins. *J Am Acad Dermatol* 27, 383-388 (1992).
133. Hammarström S, Hamberg M, Samuelsson B, Duell EA, Stawiski M, Voorhees JJ. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 5130-5134 (1975).
134. Hammarström S, Lindgren JA, Marcelo C, Duell EA, Anderson TF, Voorhees JJ. Arachidonic acid transformations in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 73, 180-183 (1979).
135. McClatchey W, Snyderman R. Prostaglandins and inflammation: enhancement of monocyte chemotactic responsiveness by prostaglandin E2. *Prostaglandins* 12, 415-426 (1976).
136. Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361 (2002).
137. Van Epps DE, Wiik A, Garcia ML, Williams RC, Jr. Enhancement of human neutrophil migration by prostaglandin E2. *Cell Immunol* 37, 142-150 (1978).
138. Armstrong RA. Investigation of the inhibitory effects of PGE2 and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. *Br J Pharmacol* 116, 2903-2908 (1995).
139. Diaz-Perez JL, Goldyne ME, Winkelmann RK. Prostaglandins and chemotaxis: enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin F2alpha. *J Invest Dermatol* 66, 149-152 (1976).
140. Goetzl EJ, Pickett WC. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 125, 1789-1791 (1980).
141. Green FA. Generation and metabolism of lipoxygenase products in normal and membrane-damaged cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 93, 486-491 (1989).
142. Brain S, Camp R, Dowd P, Black AK, Greaves M. The release of leukotriene B4-like material in biologically active amounts from the lesional skin of patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 83, 70-73 (1984).
143. Fogh K, Herlin T, Kragballe K. Eicosanoids in acute and chronic psoriatic lesions: leukotriene B4, but not 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid, is present in biologically active amounts in acute guttate lesions. *J Invest Dermatol* 92, 837-841 (1989).
144. Fogh K, Kiil J, Herlin T, Ternowitz T, Kragballe K. Heterogeneous distribution of lipoxygenase products in psoriatic skin lesions. *Arch Dermatol Res* 279, 504-511 (1987).
145. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264-265 (1980).
146. Czarnetzki BM, Rosenbach T. Chemotaxis of human neutrophils and eosinophils towards leukotriene B4 and its 20-w-oxidation products in vitro. *Prostaglandins* 31, 851-858 (1986).
147. Ternowitz T, Herlin T, Fogh K. Human monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotactic and chemokinetic responses to leukotriene B4 and FMLP. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 95, 47-54 (1987).

148. Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2148-2152 (1979).
149. Bacon KB, Camp RD. Lipid lymphocyte chemoattractants in psoriasis. *Prostaglandins* 40, 603-614 (1990).
150. Mallet AI, Cunningham FM, Daniel R. Rapid isocratic high-performance liquid chromatographic purification of platelet activating factor (PAF) and lyso-PAF from human skin. *J Chromatogr* 309, 160-164 (1984).
151. Camp RD, Mallet AI, Woollard PM, Brain SD, Black AK, Greaves MW. The identification of hydroxy fatty acids in psoriatic skin. *Prostaglandins* 26, 431-447 (1983).
152. Matzner Y, Cohn M, Hyam E, Razin E, Fuks Z, Buchanan MR, Haas TA, Vlodaysky I, Eldor A. Generation of lipid neutrophil chemoattractant by irradiated bovine aortic endothelial cells. *J Immunol* 140, 2681-2685 (1988).
153. Henricks PA, Engels F, van der Vliet H, Nijkamp FP. 9- and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and human polymorphonuclear leukocytes. *Prostaglandins* 41, 21-27 (1991).
154. Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 29, 658-663 (2004).
155. Saiag P, Coulomb B, Lebreton C, Bell E, Dubertret L. Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science* 230, 669-672 (1985).
156. Roth SJ, Carr MW, Rose SS, Springer TA. Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods* 188, 97-116 (1995).
157. Prens EP, Benne K, van Joost T, Benner R. The autologous mixed epidermal cell-T lymphocyte reaction is elevated in psoriasis: a crucial role for epidermal HLA-DR+/CD1a- antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol* 96, 880-887 (1991).
158. Cooper KD, Baadsgaard O, Ellis CN, Duell E, Voorhees JJ. Mechanisms of cyclosporine A inhibition of antigen-presenting activity in uninvolved and lesional psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 94, 649-656 (1990).
159. Etehad P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D, Camp RD. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 96, 146-151 (1994).
160. Heng MC, Kloss SG. Cell interactions in psoriasis. *Arch Dermatol* 121, 881-887 (1985).
161. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574 (1998).
162. Goebeler M, Toksoy A, Spandau U, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R. The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions. *J Pathol* 184, 89-95 (1998).
163. Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 29, 633-642 (1999).
164. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164, 6621-6632 (2000).
165. Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713-717 (1997).

- 
166. Nagira M, Imai T, Yoshida R, Takagi S, Iwasaki M, Baba M, Tabira Y, Akagi J, Nomiyama H, Yoshie O. A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol* 28, 1516-1523 (1998).
  167. Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 94, 2533-2536 (1999).
  168. Carramolino L, Zaballos A, Kremer L, Villares R, Martin P, Ardavin C, Martinez AC, Marquez G. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood* 97, 850-857 (2001).
  169. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 728 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2002).
  170. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* 144, 1105-1113 (2001).
  171. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8, 157-165 (2002).

## 8 Literaturverzeichnis, nach Autorennamen sortiert

Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713-717 (1997).

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1133 (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1254-1261 (Wiley-VCH, Weinheim, 2004).

Ameen M, Allen MH, Fisher SA, Lewis CM, Cuthbert A, Kondeatis E, Vaughan RW, Murakami H, Nakagawa H, Barker JN. Corneodesmosin (CDSN) gene association with psoriasis vulgaris in Caucasian but not in Japanese populations. *Clin Exp Dermatol* 30, 414-418 (2005).

Armstrong RA. Investigation of the inhibitory effects of PGE2 and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. *Br J Pharmacol* 116, 2903-2908 (1995).

Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiyama H, Yoshie O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem* 272, 14893-14898 (1997).

Bacon KB, Camp RD, Cunningham FM, Woollard PM. Contrasting in vitro lymphocyte chemotactic activity of the hydroxyl enantiomers of 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *Br J Pharmacol* 95, 966-974 (1988).

Bacon KB, Camp RD. Lipid lymphocyte chemoattractants in psoriasis. *Prostaglandins* 40, 603-614 (1990).

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179 (1994).

Baker BS, Bokth S, Powles A, Garioch JJ, Lewis H, Valdimarsson H, Fry L. Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 128, 493-499 (1993).

Barker JN. Pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 25, 778-781 (1998).

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640-644 (1997).

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9238-9242 (1987).

Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165 (1989).

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109 (1996).

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1925-1930 (1997).

Boehncke WH, Wortmann S, Kaufmann R, Mielke V, Sterry W. A subset of macrophages located along the basement membrane ("lining cells") is a characteristic histopathological feature of psoriasis. *Am J Dermatopathol* 17, 139-144 (1995).

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134 (1998).

- Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2148-2152 (1979).
- Bottazzi B, Introna M, Allavena P, Villa A, Mantovani A. In vitro migration of human large granular lymphocytes. *J Immunol* 134, 2316-2321 (1985).
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771 (1988).
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466 (1962).
- Brain S, Camp R, Dowd P, Black AK, Greaves M. The release of leukotriene B<sub>4</sub>-like material in biologically active amounts from the lesional skin of patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 83, 70-73 (1984).
- Bunn PA, Jr., Foss FM. T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem Suppl* 24, 12-23 (1996).
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996).
- Camp RD, Mallet AI, Woollard PM, Brain SD, Black AK, Greaves MW. The identification of hydroxy fatty acids in psoriatic skin. *Prostaglandins* 26, 431-447 (1983).
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384 (1998).
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-3656 (1994).
- Carramolino L, Zaballos A, Kremer L, Villares R, Martin P, Ardavin C, Martinez AC, Marquez G. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood* 97, 850-857 (2001).
- Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 121, 421-431 (1989).
- Christophers E, Parzefall R, Braun-Falco O. Initial events in psoriasis: quantitative assessment. *Br J Dermatol* 89, 327-334 (1973).
- Christophers E, Mrowietz U. The inflammatory infiltrate in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 131-135 (1995).
- Cole D, Van Epps DE, Williams RC, Jr. Defective T-lymphocyte chemotactic factor production in patients with established malignancy. *Clin Immunol Immunopathol* 38, 209-221 (1986).
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-2021 (1998).
- Cooper KD, Baadsgaard O, Ellis CN, Duell E, Voorhees JJ. Mechanisms of cyclosporine A inhibition of antigen-presenting activity in uninvolved and lesional psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 94, 649-656 (1990).
- Creamer D, Allen MH, Sousa A, Poston R, Barker JN. Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 136, 859-865 (1997).
- Czarnetzki BM, Rosenbach T. Chemotaxis of human neutrophils and eosinophils towards leukotriene B<sub>4</sub> and its 20-w-oxidation products in vitro. *Prostaglandins* 31, 851-858 (1986).
- Davis JM, St John J, Cheung HT. Haptotactic activity of fibronectin on lymphocyte migration in vitro. *Cell Immunol* 129, 67-79 (1990).

- Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JN. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 10, 280-285 (2001).
- Diaz-Perez JL, Goldyne ME, Winkelmann RK. Prostaglandins and chemotaxis: enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin F<sub>2</sub>alpha. *J Invest Dermatol* 66, 149-152 (1976).
- Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D, Camp RD. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 96, 146-151 (1994).
- Falk W, Goodwin RH, Jr., Leonard EJ. A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods* 33, 239-247 (1980).
- Finlay AY, Coles EC. The effect of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients. *Br J Dermatol* 132, 236-244 (1995).
- Fogh K, Kiil J, Herlin T, Ternowitz T, Kragballe K. Heterogeneous distribution of lipoxygenase products in psoriatic skin lesions. *Arch Dermatol Res* 279, 504-511 (1987).
- Fogh K, Herlin T, Kragballe K. Eicosanoids in acute and chronic psoriatic lesions: leukotriene B<sub>4</sub>, but not 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid, is present in biologically active amounts in acute guttate lesions. *J Invest Dermatol* 92, 837-841 (1989).
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264-265 (1980).
- Franitza S, Alon R, Lider O. Real-time analysis of integrin-mediated chemotactic migration of T lymphocytes within 3-D extracellular matrix-like gels. *J Immunol Methods* 225, 9-25 (1999).
- Fritsch P. 335-345 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998).
- Fukuoka M, Ogino Y, Sato H, Ohta T, Komoriya K, Nishioka K, Katayama I. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D<sub>3</sub> (tacalcitol). *Br J Dermatol* 138, 63-70 (1998).
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343, 757-760 (1990).
- Geras AJ. 127-129 (Sandoz Pharma Press, Basel, 1990).
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423 (1973).
- Gillitzer R, Wolff K, Tong D, Muller C, Yoshimura T, Hartmann AA, Stingl G, Berger R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* 101, 127-131 (1993).
- Goebeler M, Toksoy A, Spandau U, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R. The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions. *J Pathol* 184, 89-95 (1998).
- Goetzl EJ, Pickett WC. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 125, 1789-1791 (1980).
- Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC. Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154, 1403-1418 (1981).
- Green FA. Generation and metabolism of lipoxygenase products in normal and membrane-damaged cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 93, 486-491 (1989).
- Griffiths CE, Voorhees JJ. Psoriasis, T cells and autoimmunity. *J R Soc Med* 89, 315-319 (1996).

Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6367-6371 (1989).

Hammar H, Gu SQ, Johannesson A, Sundkvist KG, Biberfeld P. Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesion. *J Invest Dermatol* 83, 416-420 (1984).

Hammarström S, Hamberg M, Samuelsson B, Duell EA, Stawiski M, Voorhees JJ. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E<sub>2</sub>, and prostaglandin F<sub>2</sub>α in epidermis of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 5130-5134 (1975).

Hammarström S, Lindgren JA, Marcelo C, Duell EA, Anderson TF, Voorhees JJ. Arachidonic acid transformations in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 73, 180-183 (1979).

Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 264, 9053-9060 (1989).

Heng MC, Kloss SG. Cell interactions in psoriasis. *Arch Dermatol* 121, 881-887 (1985).

Henricks PA, Engels F, van der Vliet H, Nijkamp FP. 9- and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and human polymorphonuclear leukocytes. *Prostaglandins* 41, 21-27 (1991).

Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32 (1988).

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164, 6621-6632 (2000).

Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8, 157-165 (2002).

Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 271, 21514-21521 (1996).

Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272, 15036-15042 (1997).

Irvine GB, Shaw C. High-performance gel permeation chromatography of proteins and peptides on columns of TSK-G2000-SW and TSK-G3000-SW: a volatile solvent giving separation based on charge and size of polypeptides. *Anal Biochem* 155, 141-148 (1986).

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 1-12 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2002).

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 728 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2002).

Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE, Westphal E, Voorhees JJ, Christophers E, Kronke M. Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 54, 439-449 (1999).

Jutel M, Wyss-Coray T, Carballido JM, Blaser K, Muller UR, Pichler WJ. Selective restimulation of antigen or allergen preactivated T cells using OKT3 F(ab)<sub>2</sub> results in the secretion of TH-1 or TH-2-like cytokine patterns. *Clin Exp Allergy* 25, 1108-1117 (1995).

- Keller HU, Naef A, Zimmermann A. Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res* 153, 173-185 (1984).
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleynsteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399 (1994).
- Kim CH, Pelus LM, White JR, Applebaum E, Johanson K, Broxmeyer HE. CK beta-11/macrophage inflammatory protein-3 beta/EBI1-ligand chemokine is an efficacious chemoattractant for T and B cells. *J Immunol* 160, 2418-2424 (1998).
- Kornfeld H, Berman JS, Beer DJ, Center DM. Induction of human T lymphocyte motility by interleukin 2. *J Immunol* 134, 3887-3890 (1985).
- Krueger GG, Jorgensen C, Miller C, et al. Effects of IL-8 on epidermal proliferation. *J Invest Dermatol* 94, 545 (1990).
- Lawrence MB, Berg EL, Butcher EC, Springer TA. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. *Eur J Immunol* 25, 1025-1031 (1995).
- Lewis WH. Locomotion of lymphocytes. *Bull Johns Hopkins Hosp* 49, 29 ff. (1931).
- Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* 162, 186-194 (1999).
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-237 (1994).
- Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Faseb J* 8, 1055-1060 (1994).
- Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184, 569-577 (1996).
- Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445 (1998).
- Mallet AI, Cunningham FM, Daniel R. Rapid isocratic high-performance liquid chromatographic purification of platelet activating factor (PAF) and lyso-PAF from human skin. *J Chromatogr* 309, 160-164 (1984).
- Matzner Y, Cohn M, Hyam E, Razin E, Fuks Z, Buchanan MR, Haas TA, Vlodaysky I, Eldor A. Generation of lipid neutrophil chemoattractant by irradiated bovine aortic endothelial cells. *J Immunol* 140, 2681-2685 (1988).
- McClatchey W, Snyderman R. Prostaglandins and inflammation: enhancement of monocyte chemotactic responsiveness by prostaglandin E2. *Prostaglandins* 12, 415-426 (1976).
- McCutcheon M. Studies on the locomotion of leucocytes. III. The normal rate of locomotion of human lymphocytes in vitro. *Amer J Physiol* 69, 279 ff. (1924).
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99 (1989).
- McGregor DD, Logie PS. The mediator of cellular immunity. VII. Localization of sensitized lymphocytes in inflammatory exudates. *J Exp Med* 139, 1415-1430 (1974).
- McGregor JM, Barker JN, Ross EL, MacDonald DM. Epidermal dendritic cells in psoriasis possess a phenotype associated with antigen presentation: in situ expression of beta 2-integrins. *J Am Acad Dermatol* 27, 383-388 (1992).
- McKay IA, Leigh IM. Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 105-114 (1995).



- Messadi DV, Pober JS, Fiers W, Gimbrone MA, Jr., Murphy GF. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 139, 1557-1562 (1987).
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173 (1989).
- Mrowietz U, Ternowitz T. Monocyte chemotaxis: a method for routine in vitro investigation using lactic dehydrogenase as a marker enzyme. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 95, 1-7 (1987).
- Mrowietz U, Ternowitz T, Schroder JM, Christophers E. Recombinant human tumour necrosis factor beta (lymphotoxin) lacks chemotactic activity for human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Scand J Immunol* 30, 373-377 (1989).
- Mrowietz U, Jürgens G. A method for the determination of leukocyte migration for large sample numbers by automated densitometric quantification. *J Biochem Biophys Methods* 30, 49-58 (1995).
- Mrowietz U, Koch WA, Zhu K, Wiedow O, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Psoriasis scales contain C5a as the predominant chemotaxin for monocyte-derived dendritic cells. *Exp Dermatol* 10, 238-245 (2001).
- Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 164, 3368-3376 (2000).
- Nagira M, Imai T, Yoshida R, Takagi S, Iwasaki M, Baba M, Tabira Y, Akagi J, Nomiyama H, Yoshie O. A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol* 28, 1516-1523 (1998).
- Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94, 202-209 (1994).
- Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 188, 181-191 (1998).
- Nickoloff BJ, Griffiths CE. Lymphocyte trafficking in psoriasis: a new perspective emphasizing the dermal dendrocyte with active dermal recruitment mediated via endothelial cells followed by intra-epidermal T-cell activation. *J Invest Dermatol* 95, 35S-37S (1990).
- Nikaein A, Morris L, Phillips C, Soliman M, Ordonez G, Silverman A, Stone MJ, Menter A. Characterization of T-cell clones generated from skin of patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 28, 551-557 (1993).
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9, 617-648 (1991).
- Placek W, Haftek M, Thivolet J. Sequence of changes in psoriatic epidermis. Immunocompetent cell redistribution precedes altered expression of keratinocyte differentiation markers. *Acta Derm Venereol* 68, 369-377 (1988).
- Pleass R, Camp R. Cytokines induce lymphocyte migration in vitro by direct, receptor-specific mechanisms. *Eur J Immunol* 24, 273-276 (1994).
- Prens E, Debets R, Hegmans J. T lymphocytes in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 115-129 (1995).
- Prens EP, Benne K, van Joost T, Benner R. The autologous mixed epidermal cell-T lymphocyte reaction is elevated in psoriasis: a crucial role for epidermal HLA-DR+/CD1a- antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol* 96, 880-887 (1991).
- Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM, Schall TJ, Ruff MR, Pert CB. Upregulation of RANTES in psoriatic keratinocytes: a possible pathogenic mechanism for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 79, 9-11 (1999).
- Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* 144, 1105-1113 (2001).

- Roth SJ, Carr MW, Rose SS, Springer TA. Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods* 188, 97-116 (1995).
- Russell RJ, Wilkinson PC, Sless F, Parrott DM. Chemotaxis of lymphoblasts. *Nature* 256, 646-648 (1975).
- Saiag P, Coulomb B, Lebreton C, Bell E, Dubertret L. Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science* 230, 669-672 (1985).
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574 (1998).
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883 (1998).
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361 (2002).
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379 (1987).
- Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102, 145-149 (1994).
- Schröder JM, Christophers E. Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales. *J Invest Dermatol* 87, 53-58 (1986).
- Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 139, 3474-3483 (1987).
- Schröder JM. Inflammatory mediators and chemoattractants. *Clin Dermatol* 13, 137-150 (1995).
- Schröder JM. Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol* 288, 266-297 (1997).
- Schubert C, Christophers E. Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis. *Arch Dermatol Res* 277, 352-358 (1985).
- Selvan RS, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of IL-2, IL-4 and IL-6 in the growth and differentiation of tumor-specific CD4+ T helper and CD8+ T cytotoxic cells. *Int J Cancer* 45, 1096-1104 (1990).
- Smith CH, Barker JN. Cell trafficking and role of adhesion molecules in psoriasis. *Clin Dermatol* 13, 151-160 (1995).
- Snyderman R, Altman LC, Hausman MS, Mergenhagen SE. Human mononuclear leukocyte chemotaxis: a quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J Immunol* 108, 857-860 (1972).
- Snyderman R, Goetzel EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213, 830-837 (1981).
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933 (1988).
- Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339, 61-64 (1989).
- Swensson O, Schubert C, Christophers E, Schroder JM. Inflammatory properties of neutrophil-activating protein-1/interleukin 8 (NAP-1/IL-8) in human skin: a light- and electronmicroscopic study. *J Invest Dermatol* 96, 682-689 (1991).
- Takematsu H, Tagami H. Quantification of chemotactic peptides (C5a anaphylatoxin and IL-8) in psoriatic lesional skin. *Arch Dermatol* 129, 74-80 (1993).

- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361, 79-82 (1993).
- Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 29, 633-642 (1999).
- Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284, 819-822 (1999).
- Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358 (1993).
- Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177, 1809-1814 (1993).
- Taub DD, Lloyd AR, Wang JM, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol* 351, 139-146 (1993).
- Taub DD, Key ML, Clark D, Turcovski-Corrales SM. Chemotaxis of T lymphocytes on extracellular matrix proteins. Analysis of the in vitro method to quantitate chemotaxis of human T cells. *J Immunol Methods* 184, 187-198 (1995).
- Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95, 1370-1376 (1995).
- Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 29, 658-663 (2004).
- Ternowitz T. Human monocyte and neutrophil chemotaxis in vitro employing 51Cr-labelled leukocytes. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 93, 189-193 (1985).
- Ternowitz T, Thestrup-Pedersen K. Epidermis and lymphocyte interactions during a tuberculin skin reaction. II. Epidermis contains specific lymphocyte chemotactic factors. *J Invest Dermatol* 87, 613-616 (1986).
- Ternowitz T, Herlin T, Fogh K. Human monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotactic and chemokinetic responses to leukotriene B4 and FMLP. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 95, 47-54 (1987).
- Toothill VJ, Van Mourik JA, Niewenhuis HK, Metzelaar MJ, Pearson JD. Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *J Immunol* 145, 283-291 (1990).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354 (1979).
- Tse H, Rosenthal A. in *Inflammation: basic principles and clinical correlates* 631-649 (Raven Press, LTD, New York, 1988).
- Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: A disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7, 256-259 (1986).
- van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C. Epithelium-lining macrophages in psoriasis. *Br J Dermatol* 130, 589-594 (1994).
- Van Epps DE, Wiik A, Garcia ML, Williams RC, Jr. Enhancement of human neutrophil migration by prostaglandin E2. *Cell Immunol* 37, 142-150 (1978).
- Verwilghen J, Baroja ML, Van Vaeck F, Van Damme J, Ceuppens JL. Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunology* 72, 269-276 (1991).
- Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24, 2377-2382 (1994).

- Wilkinson P. 63 (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982).
- Wilkinson P. 105 (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982).
- Wilkinson PC. Lymphocyte locomotion "in vitro": the role of growth activators and chemoattractants. *Biomed Pharmacother* 41, 329-336 (1987).
- Willmann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28, 2025-2034 (1998).
- Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98, 1878-1887 (1996).
- Wustrow TP. Interactions and biological mechanisms of action of molecular signal peptides. II. Interleukin 2 (IL-2). *Hno* 39, 323-331 (1991).
- Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J, Wang JM. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* 255, 67-73 (1998).
- Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiya H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 272, 13803-13809 (1997).
- Yoshie O, Imai T, Nomiya H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 62, 634-644 (1997).
- Yoshizaki K, Nishimoto N, Matsumoto K, Tagoh H, Taga T, Deguchi Y, Kuritani T, Hirano T, Hashimoto K, Okada N, et al. Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes. *Cytokine* 2, 381-387 (1990).
- Youn BS, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 94, 2533-2536 (1999).
- Zachariae CO, Kalfot K, Thestrup-Pedersen K. Human T lymphocytes and T-cell lines as target cells for lymphocyte chemotaxis. *Arch Dermatol Res* 284, 77-81 (1992).
- Zachariae CO. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh) 181, 1-37 (1993).
- Zheng M, Yang H, Mrowietz U. Isolation of human monocyte subpopulations by single-step counterflow centrifugation elutriation using a Sanderson chamber. Phenotypical and functional characterization of isolated cells. *Clin Biotechnol* 3, 197-201 (1991).
- Zheng M, Sun G, Mrowietz U. The chemotactic activity of T-lymphocytes in response to interleukin 8 is significantly decreased in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 5, 334-340 (1996).
- Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137, 387-410 (1973).

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz danke ich herzlich für seine fachliche Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte, sowie für eine persönliche und freundliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, der mich bei den biochemischen Arbeiten durch wertvolle Hinweise unterstützte und dessen Anregungen und Kritik wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Anja Ziegenhagen schulterte die Last meiner Einarbeitung in die Techniken der Zellbiologie souverän, Zhu Kejian war unermüdlich für mich auf der Suche nach Spenderblut. Beiden danke ich für ihre kollegiale Hilfe und den freundschaftlichen Umgang.

Den Mitarbeitern der Universitäts-Hautklinik Kiel danke ich für Blutentnahmen, technische Einweisungen, Unterstützung in Computerfragen, Photoarbeiten, Kaffee und Gespräche.

Mein guter Freund Wolf gab wichtige Impulse zur Strukturierung und Niederschrift der vorliegenden Arbeit. Vielen Dank dafür.

Meiner Frau Burga danke ich für erstaunliche Geduld und ihre Liebe, die mir Zuversicht und Kraft gibt.

## Anhang

Hiermit erkläre ich, daß die vorgelegte Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Ferner erkläre ich, daß sie weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat, veröffentlicht worden ist oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde.

---

Andreas Koch