

Aus der Abteilung Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)  
im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Expression der kostimulatorischen Moleküle  
ILA (CD137) und ICOS (CD278) sowie ihrer Liganden  
auf Mastzellen und T-Zellen der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Marcel Knosalla  
aus  
Wolfenbüttel

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Ch. Neumann
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
III. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung:	21.11.2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
I. 1.	Geschichte, Epidemiologie und Pathogenese der Psoriasis .....	6
I. 2.	Bedeutung der Mastzelle .....	11
I. 3.	Bedeutung der T-Zelle.....	16
I. 4.	Zell-Zell-Kommunikation und Kostimulation .....	17
I. 5.	Bedeutung des ILA-Systems .....	18
I. 6.	Bedeutung des ICOS-Systems.....	19
I. 7.	Fragestellung.....	21
<b>II.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>24</b>
II. 1.	Auswahl der Psoriasis-erkrankten .....	24
II. 2.	Auswahl der gesunden Kontrollgruppe.....	25
II. 3.	Einbettung der Hautstanzen in AMeX und Anfertigung von Gewebeschnitten.....	25
II. 4.	Entparaffinierung von Gewebeschnitten.....	25
II. 5.	Primärantikörper .....	26
II. 6.	Sekundärantikörper, Chromogene und Fluoreszenzstoffe .....	27
II. 7.	Konventionelle immunhistochemische Färbung ohne Tyramid-Verstärkung.....	28
II. 8.	Konventionelle immunhistochemische Färbung mit Tyramid-Verstärkung .....	29
II. 9.	Doppelimmunfluoreszenz mit einem Tyramid-Verstärkungssystem .....	30
II. 10.	Doppelimmunfluoreszenz mit zwei Tyramid-Verstärkungssystemen .....	32
II. 11.	Konfokale Mikroskopie und Quantifizierung .....	33
II. 12.	Auswertung und Quantifizierung.....	34
II. 13.	Statistik.....	34

<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
III. 1.	Expression von ILA-Rezeptor beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen.....	38
III. 2.	Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	40
III. 3.	Verlässlichkeit der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen und der Auswertung durch den Untersucher.....	47
III. 4.	Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	51
III. 5.	Expression von ICOS-Rezeptor beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen.....	56
III. 6.	Expression von ICOS-Rezeptor auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	56
III. 7.	Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	59
III. 8.	Expression von ICOS-Rezeptor auf dendritischen Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	62
III. 9.	Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	63
III. 10.	Expression von ILA- und ICOS-Ligand beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen.....	68
III. 11.	Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	69
III. 12.	Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	70
III. 13.	Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	75
III. 14.	Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen.....	76
III. 15.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81

<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>84</b>
IV. 1.	Etablierung der Methode .....	84
IV. 2.	Statistische Problematik .....	88
IV. 3.	Bedeutung der kostimulatorischen Mediatorsysteme ILA und ICOS auf Mastzellen und T-Zellen .....	88
IV. 4.	Dysregulation des Negativ-Rückkopplungs-/Feedback- Mechanismus des ILA- und ICOS-Systems .....	91
IV. 5.	Bedeutung der Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen und T-Zellen .....	93
IV. 6.	Bedeutung der kostimulatorischen Mediatorsysteme ILA und ICOS in nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten .....	94
IV. 7.	T-Zellen in der Psoriasis sind ICOS-Rezeptor-negativ .....	94
IV. 8.	Identifizierung der ICOS-Rezeptor-positiven Zelle in der Psoriasis .....	96
IV. 9.	Bedeutung des ILA- und ICOS-Liganden in der Psoriasis .....	98
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>100</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>122</b>

## **I. Einleitung**

### **I. 1. Geschichte, Epidemiologie und Pathogenese der Psoriasis**

Hautveränderungen, die der Psoriasis entsprechen könnten, sind bereits in der Bibel beschrieben (Sabat et al. 2007). Die erste dokumentierte Beschreibung ist im Alten Testament (Lev 13,3) zu finden: „Der Priester soll das Übel auf der Haut untersuchen. Wenn das Haar an der kranken Stelle weiß wurde und die Stelle tiefer als die übrige Haut liegt, ist es Aussatz. Nachdem der Priester das Übel untersucht hat, soll er den Erkrankten für unrein erklären.“

Erstmals wurde eine schuppige Hauterkrankung im Altertum beschrieben. Psoriasis stammt aus dem Griechischen und wird mit „Krätze“ übersetzt. Der Begriff „Psoriasis“ wurde zunächst für schuppige Hautkrankheiten unterschiedlicher Ursache benutzt.

Erst um 1841 wurde die Psoriasis von dem österreichischen Hautarzt Ferdinand Ritter von Hebra (1816 - 1880) als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben und von anderen schuppigen Hauterkrankungen abgegrenzt (zur Übersicht siehe: Schön und Boehncke 2005).

Heute wissen wir, dass es sich bei der Psoriasis um eine erbliche Dispositionserkrankung mit polygener und multifaktorieller Vererbung handelt. Es handelt sich um eine bei Europäern sehr häufige Hauterkrankung mit einer Morbidität von ca. 2 Prozent (Christophers 2001).

Einige Genloci haben sich in Studien als relevant für die Entstehung der Psoriasis herausgestellt, besonders zu erwähnen sind die Genloci PSORS1 bis PSORS9. Insbesondere PSORS1 ist in 35% bis 50% der Fälle mit einer Psoriasis assoziiert (Nestle et al. 2009, Schön und Boehncke 2005).

Bei der chronisch-stationären Form der Psoriasis finden sich chronische, scharf demarkierte, dunkelrote, schuppige Plaques, die vor allem an den Streckseiten der Extremitäten sowie auf der Kopfhaut lokalisiert sind (zur Übersicht siehe: Wilsmann-

Theis et al. 2008, Schön und Boehncke 2005). Die Psoriasis-Arthritis ist eine extrakutane Manifestationsform und tritt in etwa 20% der Fälle auf (Schön und Boehncke 2005). Neben vermuteten genetischen Faktoren spielen Umwelteinflüsse wie Infektionen, Stress, Traumen und Rauchen sowie Alkohol eine auslösende Rolle.

Als „Köbner-Phänomen“ bezeichnet man die Entstehung einer Psoriasisläsion 7 bis 14 Tage nach einem mechanischen Trauma auf zuvor unbetreffener Haut (Wilsmann-Theis et al. 2008). Dies wird möglicherweise durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine oder die Demaskierung von Autoantigenen bewirkt (Schön und Boehncke 2005).

Wie zahlreiche Arbeiten (Camp 1998, Schön und Boehncke 2005, Nestle et al. 2009) zusammenfassen, ist die Psoriasis durch einen inflammatorischen Hautgewebsprozess mit einer Hyperproliferation der Keratinozyten und Hyperkeratose und gestört ablaufenden Verhornung (Parakeratose) mit der Folge einer Verdickung der Epidermis (Akanthose) gekennzeichnet. Bei der Pathogenese der Psoriasis ist von einer Autoimmunerkrankung auszugehen und es finden sich eine verstärkte Angiogenese und eine Infiltration von T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten/ Makrophagen und Neutrophilen sowie eine Vermehrung von Mastzellen. Die Vermehrung der T-Zellen wurde lange als das zentrale Ereignis in der Pathogenese der Psoriasis betrachtet. Dieser Prozess wird unterhalten durch proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$  (IL = Interleukin), IL-8 und IL-12 (Bos und De Rie 1999).

Bei der Psoriasis lassen sich in der Epidermis und in der oberen Dermis CD3-positive (CD = „cluster of differentiation“) T-Zellen in einem gemischten entzündlichen Infiltrat nachweisen (Schön und Boehncke 2005). Bei der Psoriasis überwiegen TH1-Zellen (TH = T-Helfer), welche IFN- $\gamma$  sezernieren, gegenüber IL-4-produzierenden TH2-Zellen (Wilsmann-Theis et al. 2008).

In den letzten Jahren konnte auch eine wesentliche Rolle der TH17-Zelle in der Pathogenese der Psoriasis gezeigt werden (Wilson et al. 2007). Diese Zellen produzieren neben IL-17 auch IL-22, IL-26 und teilweise IFN- $\gamma$ . Somit gilt die Psoriasis heute als TH1/TH17-vermittelte Erkrankung.

In betroffener Haut von Psoriasis-erkrankten konnte auch gezeigt werden, dass die Zahl von plasmazytoiden dendritischen Zellen, die Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) produzieren, erhöht ist (Nestle et al. 2005). Es wird vermutet, dass IFN- $\alpha$  ein wichtiger, die Psoriasis induzierender Faktor ist (Nestle et al. 2009).

Auch Keratinozyten sind an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt. Sie werden unter anderem durch TNF, IL-17, IL-20 oder IL-22 in ihrer Differenzierung beeinflusst und produzieren selbst beispielsweise IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  (Nestle et al. 2009).

Auch gibt es Hinweise darauf, dass antiinflammatorische Faktoren wie IL-10, IL-4 und IL-5 in der Psoriasisläsion relativ erniedrigt sind oder vermindert produziert werden (Asadullah et al. 1998, Bigler et al. 1992, Gruaz-Chatellard et al. 1991, Nickoloff et al. 1994, Schön und Boehncke 2005). Solche Veränderungen des Zytokinniveaus finden sich bemerkenswerterweise nicht nur in befallener, sondern auch in unbeefallener Haut (Uyemura et al. 1993, Asadullah et al. 1998, Bonifati et al. 1994, Austin et al. 1999, Reich et al. 2002, Reich et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass bereits die unbeefallene Psoriasis-Haut immunologische Abweichungen aufweist, was auch durch die Ergebnisse, welche in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, weiter unterstützt wird.

Zytokine und Chemokine spielen in der Pathogenese der Psoriasis eine zentrale Rolle (Schön und Boehncke 2005): IFN- $\gamma$  kann die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (MHC = „major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex) und ICAM-1 („intercellular adhesion molecule 1“, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, synonym CD54) stimulieren. VEGF („vascular endothelial growth factor“, gefäßendothelialer Wachstumsfaktor) und TNF- $\alpha$  stimulieren die Angiogenese. IL-1 aktiviert Mastzellen. GM-CSF („granulocyte/macrophage colony-stimulating factor“, Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) aktiviert Neutrophile, die in der Psoriasisläsion stark vermehrt sind. IL-6 und TGF- $\alpha$  („transforming growth factor  $\alpha$ “, transformierender Wachstumsfaktor  $\alpha$ ) begünstigen die Keratinozytenproliferation, die in der Psoriasisläsion gesteigert ist. MIG („monokine induced by interferon  $\gamma$ “, Interferon- $\gamma$ -induziertes Monokin) wird von Endothelzellen und von Makrophagen exprimiert und lockt T-Zellen an. MIG selbst wird durch IFN- $\gamma$  induziert, welches selbst von TH1-

Zellen gebildet wird. Somit wirkt dieser Mechanismus entzündungsverstärkend. Zahlreiche weitere Zytokine und Chemokine sind an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt, wie bereits oben aufgeführt wurde. Dieser Prozess ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ein Modell für die Immunpathogenese der Psoriasis (Sabat et al. 2007) unterscheidet eine Sensibilisierungsphase und eine Effektorphase:

In der Sensibilisierungsphase nehmen antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen, Antigen auf. Dendritische Zellen prozessieren das Antigen, reifen und wandern zu regionalen Lymphknoten, wo sie auf Ihrer Oberfläche mittels MHC-Klasse-II-Molekülen Antigenpeptide den CD4-T-Zellen präsentieren. Hierdurch werden Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen generiert. Die Präsentation des Antigens erfolgt über MHC-Klasse-II-Moleküle und den T-Zell-Rezeptor (TCR). Über MHC-Klasse-I-Moleküle werden auch CD8-T-Zellen aktiviert.

In der Sensibilisierungsphase erfolgt die Generation von Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen bedarf dreier Signale, zum Ersten der Interaktion von MHC-Klasse-II-Molekül mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR), zum Zweiten der Interaktion kostimulatorischer Moleküle mit ihren Liganden und zum Dritten löslicher Mediatoren.

Auf die kostimulatorischen Moleküle auf dendritischen Zellen, Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen und insbesondere das ILA-System (ILA = „induced by lymphocyte activation“) und ICOS-System (ICOS = „inducible costimulator“) wird in den folgenden Kapiteln I. 4. bis I. 6. näher eingegangen.

Naive CD4-T-Zellen reifen in der Sensibilisierungsphase zu TH1-Zellen, TH2-Zellen und TH17-Zellen. Die Differenzierung wird im Wesentlichen durch die löslichen Mediatoren bewirkt. IFN- $\gamma$  und IL-12 begünstigen die Differenzierung zu TH1-Zellen, IL-6 und IL-23 begünstigen die Differenzierung zu TH17-Zellen, IL-4 begünstigt die Differenzierung zu TH2-Zellen. TH1-Zellen produzieren vor allem IFN- $\gamma$ , IL-26, GM-CSF und Tumor Nekrose Faktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). TH2-Zellen sezernieren typischerweise IL-4, IL-5 und IL-13, TH17-Zellen IL-6, IL-17 und IL-22.

In der Effektorphase wandern immunkompetente Zellen, insbesondere T-Zellen, in die Haut ein. Des Weiteren migrieren Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killer (NK)-Zellen und neutrophile Granulozyten. Bei der Diapedese sind Gefäßendothelzellen und Chemokine beteiligt. T-Zellen migrieren nicht nur in läsionale Psoriasis-Haut, sondern, wenn auch in geringerem Maße, auch in nicht-läsionale, unbetreffene Haut von Psoriasis-erkrankten. Letztere, obwohl phänomenologisch unauffällig, zeigt gegenüber der Haut gesunder Probanden eine höhere Anzahl T-Zellen (Lowe et al. 2005). In der Psoriasisläsion lässt sich sowohl in der Epidermis als auch in der oberen Dermis eine Vielzahl CD3-positiver T-Zellen nachweisen (Schön und Boehncke 2005). Bei der Initiierung dominieren CD4-T-Zellen, im Verlauf der Erkrankung dominieren dann CD8-T-Zellen in der Epidermis und CD4-T-Zellen in der oberen Dermis (Christophers und Mrowietz 2005).

Bis vor kurzem galt die Psoriasis als eine TH1-vermittelte Erkrankung, da u.a. gezeigt worden war (Schlaak et al. 1994), dass T-Zellen aus Psoriasis-Haut viel IL-2 und IFN- $\gamma$  produzieren und nur wenig oder kein IL-4, IL-10 und TNF- $\alpha$ . Kürzlich konnte auch eine Produktion von IL-22 und IL-17 durch T-Zellen in Psoriasis-Haut gezeigt werden, wodurch die Rolle der TH17-Zelle in der Pathogenese der Psoriasis an Bedeutung gewonnen hat, wie zahlreiche neuere Publikationen belegen (Wilson et al. 2007, Lowe et al. 2007, Fitch et al. 2007, Zaba et al. 2007, Chan et al. 2006).

In der Effektorphase werden die T-Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert. In betroffener Haut von Psoriasis-erkrankten konnte gezeigt werden, dass die Zahl von plasmazytoiden dendritischen Zellen, die IFN- $\alpha$  produzieren, erhöht ist (Nestle et al. 2005). Es wird vermutet, dass IFN- $\alpha$  die Psoriasis induziert (Nestle et al. 2009). Auch NK-Zellen sind in läsionaler Psoriasis-Haut gegenüber gesunder Haut vermehrt. Und auch Keratinozyten beeinflussen die T-Zellen. Es ist bekannt, dass Keratinozyten MHC-Klasse-II-Moleküle und ICAM-1 exprimieren können (Griffiths et al. 1989), was auf eine Aktivierung dieser Zellen hinweist.

IFN- $\gamma$  spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis in der Effektorphase: Es kann die Immigration von Immunzellen in die Haut fördern, Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen und Gefäßendothelzellen aktivieren und MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle sowie ICAM-1 auf Keratinozyten

hochregulieren. Möglicherweise spielt  $\text{IFN-}\gamma$  bei der Aktivierung der Keratinozyten in der Psoriasis eine Rolle.  $\text{TNF-}\alpha$  kann  $\text{TGF-}\alpha$  in Keratinozyten induzieren, welches die Proliferation von Keratinozyten fördert. IL-20 und IL-22 beeinflussen als Mediatoren die Differenzierung der Keratinozyten, was die These der zentralen Rolle von TH1- und TH17-Zellen in der Psoriasis unterstützt.

## **I. 2. Bedeutung der Mastzelle**

Die Mastzelle wurde 1877 erstmals durch Paul Ehrlich beschrieben (Kneilling und Röcken 2009). Die zentrale Rolle in der IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion (wie z.B. im Rahmen der Anaphylaxie oder allergischen Rhinitis), Asthma und Urtikaria ist seit längerem gut bekannt (Kneilling und Röcken 2009, Galli et al. 2008 a, Metcalfe et al. 1997). Nach Aktivierung sezernieren Mastzellen eine Vielzahl gespeicherter und neu synthetisierter Mediatoren und exprimieren eine Vielzahl von Zytokinrezeptoren an ihrer Oberfläche (Lippert et al. 1998, Lippert et al. 2004 b). So können Histamin, Tryptase, Prostaglandin  $\text{D}_2$  ( $\text{PGD}_2$ ), PDGF („platelet-derived growth factor“, Plättchen-abstammender Wachstumsfaktor), IL-8, IL-13, VEGF und TNF von Mastzellen sezerniert werden (Möller et al. 1993, Moon et al. 2010).

Hinzu kommen biologische Funktionen bei Entzündungsreaktionen, parasitären, bakteriellen und viralen Infektionen (Henz et al. 2001). Die Mastzelle spielt aber auch in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Encephalomyelitis disseminata, rheumatoider Arthritis oder Psoriasis eine Rolle (Kneilling und Röcken 2009, Metz et al. 2007, Galli et al. 2008 b, Sayed et al. 2008, Bischoff und Krämer 2007).

Mastzellen können Histamin,  $\text{TNF-}\alpha$ , Prostaglandine, Leukotriene sowie zahlreiche Zytokine und Chemokine speichern; zu den von Mastzellen produzierten Mediatoren zählen IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, IL-18,  $\text{TNF-}\alpha$ , transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ “,  $\text{TGF-}\beta$ ),  $\text{IFN-}\gamma$ , Prostaglandine, Leukotriene, VEGF, CXCL2, CXCL10, Makrophagen-inflammatorisches Protein („macrophage inflammatory protein“, MIP)- $1\alpha$  (CCL3), MIP- $1\beta$  (CCL4) (Kneilling und Röcken 2009, Grützkau et al. 1998).

Als einzige Zelle in der Entzündungsreaktion ist die Mastzelle in der Lage,

proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-8 in ihren Granula zu speichern und nach Aktivierung zu sezernieren (Gordon und Galli 1991, Möller et al. 1993, Grützkau et al. 1997). Zudem sezerniert sie chemotaktische Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-16 und Lymphotaktin, durch die sie Entzündungszellen, zu denen auch T-Lymphozyten gehören, rekrutiert und aktiviert. Durch Mediatoren wie Histamin, VEGF, TNF- $\alpha$  und IL-8 ist die Mastzelle an der Angiogenese beteiligt.

Die aktivierte Mastzelle kann Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie IFN- $\gamma$  oder TNF sowie Gefäßbildungsfaktoren wie VEGF bilden und sezernieren (Kneilling und Röcken 2009, Grützkau et al. 1998). Mastzellen sezernieren angiogenetische Faktoren, wodurch die Revaskularisation und Reepithelisation von geschädigtem Gewebe begünstigt wird (Moon et al. 2010). Die Angiogenese spielt im Rahmen der Wundheilung und des Tumorwachstums eine zentrale Rolle. Durch angiogenetische Mediatoren kommt der Mastzelle auch in der Malignomentstehung eine Bedeutung zu (Moon et al. 2010). Die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten wird induziert durch VEGF, PDGF, NGF („nerve growth factor“, Nervenwachstumsfaktor), welche von Mastzellen sezerniert werden können (Moon et al. 2010).

Bei bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen kommt der Mastzelle eine zentrale Rolle durch Interaktion mit den antigenpräsentierenden Zellen zu (Kneilling und Röcken 2009). Die Mastzelle kann zentrale Funktionen der antigenpräsentierenden Zellen wie Antigenpräsentation, Migration und Differenzierung beeinflussen. Außerdem ist die Mastzelle in der Lage, Komplementrezeptoren oder CD48 zu exprimieren.

Nach Stimulation können Mastzellen MHC-Moleküle exprimieren, sind an der Antigenerkennung beteiligt und beeinflussen durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4 möglicherweise die Differenzierung der T-Zellen in TH-Zellen des Subtyps TH1 und TH2 (Metcalfe et al. 1997).

Mastzellen sind also auch immunkompetente Zellen, wie neuere Erkenntnisse bestätigen (Moon et al. 2010). Mastzellen können gespeicherte Mediatoren freisetzen, die zur Rekrutierung von Effektorzellen, wie beispielsweise neutrophilen Granulozyten, führen. Außerdem können Mastzellen dendritische Zellen und T-Zellen

aktivieren. Mastzellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und können nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF oder LPS (Lipopolysaccharid) auch MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren.

Eine wichtige Veränderung der Psoriasisplaque ist die Vermehrung von Hautmastzellen, wie aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist (Harvima et al. 2008, Kneilling und Röcken 2009, Jiang et al. 2001). Mastzellen sind in der läsionalen Haut von Psoriasis-erkrankten in der oberen Dermis vermehrt.

Aus den vorausgegangenen Ausführungen lässt sich vermuten, dass der Mastzelle auch in der Pathogenese der Psoriasis eine Bedeutung zukommt, wie auch Harvima et al. 2008 zusammenfassten.

Die Mastzelle kann eine große Anzahl löslicher Mediatoren sezernieren, hierzu zählen Proteinase, Histamin, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Die Mastzelle kann auf ihrer Oberfläche kostimulatorische Rezeptoren und Liganden, u.a. aus der Familie der TNF-Rezeptoren-Familie, wie also z.B. ILA, sowie MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren (Lippert et al. 2004 a, Lippert et al. 2007). Hierüber kann die Mastzelle mit anderen Zellen interagieren, beispielsweise mit Endothelzellen, Keratinozyten, Nervenzellen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen. Hierüber kann die Entzündungsreaktion der Haut begünstigt werden. Proinflammatorische Zytokine wie Histamin, Heparin und TNF- $\alpha$  aus Mastzellen können in der Entwicklung und Unterhaltung der Psoriasisplaque von Bedeutung sein, denn Heparin und Histamin begünstigen die Vasodilatation und Angiogenese.

Die Mastzelle kann eine Vielzahl von Chemokinen, Zytokinen und Oberflächenmolekülen exprimieren, die sie auch mit dem spezifischen, T-Zell-vermittelten Immunsystem verknüpfen (Harvima et al. 2008, Galli et al. 2005). Die Induktion von TH17-Zellen, die bei der Psoriasis von Bedeutung sind, wird durch IL-6 und TGF- $\beta$  reguliert und durch IL-23 aufrechterhalten. Diese Zytokine können von Mastzellen produziert werden (Kneilling und Röcken 2009, Harvima et al. 2008, Krüger-Krasagakes et al. 1996).

Im Mausexperiment mit einer transgenen Maus mit Atemwegserkrankung konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  aus Mastzellen in einer TH17-Zell-vermittelten Entzündung die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wesentlich beeinflusst und damit die Entzündung unterhält (Nakae et al. 2007). Die Interaktion von Mastzellen mit T-Zellen konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Harvima et al. 2008, Mekori und Metcalfe 1999, Sayed und Brown 2007). Es ist bekannt, dass Mastzellen Mitglieder der TNF-Rezeptoren-Familie exprimieren, z.B. den OX40-Liganden und den CD30-Liganden, und so mit T-Zellen interagieren. Über MHC-Klasse-II-Moleküle können Mastzellen den T-Zellen Antigen präsentieren und diese aktivieren. Es ist mittlerweile auch bekannt, dass nicht nur dendritische Zellen, sondern auch Mastzellen CD80 und CD86 exprimieren können. Diese Oberflächenmoleküle sind kostimulatorische Moleküle für die Aktivierung von T-Zellen. Auch Mastzellen selbst können durch T-Zellen über einen Zell-Zell-Kontakt aktiviert werden, was zu einer Degranulation und Migration der Mastzellen führen kann.

In läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten sind Mastzellen in der oberen Dermis vermehrt und Mastzellen zeigen hier eine stärkere Expression von IFN- $\gamma$  als in unbeeinträchtigter Haut von Psoriasis-erkrankten (Ackermann et al. 1999, Harvima et al. 2008). In der Psoriasis-Plaques sind ca. 70% der Mastzellen IFN- $\gamma$ -positiv (Kneilling und Röcken 2009), was die bedeutende Rolle der Mastzelle in der Pathogenese der Psoriasis weiter unterstützt. IFN- $\gamma$  spielt, wie bereits ausgeführt, durch seine Fähigkeit, eine Vielzahl an Zellen zu aktivieren, in der Pathogenese der Psoriasis in der Effektorphase eine zentrale Rolle (Sabat et al. 2007).

Eine Aktivierung der Mastzelle ist auch durch IgG über den Fc $\gamma$ RIIa-Rezeptor möglich. Auf Mastzellen kann auch der IgG-Rezeptor Fc $\gamma$ RI (CD64) durch IFN- $\gamma$  induziert werden (Harvima et al. 2008), und in läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten findet sich eine hohe Expression von CD64.

Mastzellen können den CD30-Liganden exprimieren. Eine Aktivierung von T-Zellen *in vitro* über CD30 auf ihrer Membran bewirkte eine Sekretion von IFN- $\gamma$  durch TH1-Zellen (Ackermann und Harvima 1998, Bengtsson et al. 2000). Auch die Mastzellen selber können über den CD30-Liganden aktiviert und zur Expression von IL-8, MIP-

$1\alpha$  und MIP-1 $\beta$  stimuliert werden (Ackermann und Harvima 1998).

TNF- $\alpha$  ist ein in der Pathogenese der Psoriasis wesentliches Zytokin (Sabat et al. 2007, Harvima et al. 2008), was durch die therapeutische Effektivität von TNF- $\alpha$ -Blockern bestätigt wird. Es ist bekannt, dass Mastzellen TNF- $\alpha$  speichern können und in der Haut von Psoriasis-erkrankten vermehrt sind (Harvima et al. 2008, Ackermann et al. 1998). TNF- $\alpha$  kann TGF- $\alpha$  in Keratinozyten induzieren, welches die Proliferation von Keratinozyten fördert. TNF- $\alpha$  bewirkt eine Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen, die den Einstrom von Entzündungszellen in das Gewebe begünstigen (Jiang et al. 2001).

Die Mastzelle enthält in ihren Granula große Mengen Tryptase. Die Bedeutung von Tryptase in der Entstehung der Psoriasis ist nicht geklärt (Harvima et al. 2008). Es ist jedoch aus in-vitro-Versuchen bekannt, dass Tryptase in der Angiogenese von Bedeutung ist. Tryptase kann Endothelzellen zur Produktion von Monozyten-chemotaktischem Protein („monocyte chemotactic protein“, MCP)-1 und IL-8 stimulieren, die wiederum neutrophile Granulozyten und andere Immunzellen anlocken. Auch ist bekannt, dass Tryptase mononukleäre Zellen des Blutes zur Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , neutrophile Granulozyten zur Sekretion von IL-8 und T-Zellen zur Freisetzung von IL-6 stimulieren kann. Tryptase kann auch autokrin und parakrin eine Aktivierung von Mastzellen bewirken und kann damit eine Potenzierung der Inflammation bewirken. Tryptase kann auch Keratinozyten aktivieren und damit deren Phagozytosefähigkeit begünstigen (Sharlow et al. 2000), eine Expression von ICAM-1 bewirken und die Freisetzung von IL-8 begünstigen.

Histamin, welches von Mastzellen sezerniert wird, kann Keratinozyten über den H1-Rezeptor zu einer vermehrten Expression von IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 stimulieren (Harvima et al. 2008).

Mastzellen können immunologisch oder auch mechanisch aktiviert werden (Kneilling und Röcken 2009). In nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten wurde experimentell ein Köbner-Phänomen ausgelöst. Dabei wurde eine erste Vermehrung von Mastzellen am 4. Tag nach Stimulation und mit einem Maximum am 14. Tag, gleichzeitig mit dem Erscheinen des Köbner-Phänomens, beobachtet (Toruniowa

und Jablonska 1988). Dies legt die Bedeutung der Mastzelle und ihrer Mediatoren bereits bei der Entstehung der Psoriasis nahe.

### **I. 3. Bedeutung der T-Zelle**

Es ist bekannt, dass T-Zellen ihrerseits mit Mastzellen interagieren (Mekori und Metcalfe 1999, Sayed und Brown 2007). Der Kontakt zwischen Mastzellen und T-Zellen ist bidirektional. So konnte gezeigt werden, dass durch Zellkontakte zwischen T-Zellen und Mastzellen eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Histamin, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Mastzellen erfolgt (Bhattacharyya et al. 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zytokine, die von Mastzellen sezerniert werden, wie IL-16 und Lymphotaktin, T-Zellen zur Migration beeinflussen und dass die Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$ , die ebenfalls von Mastzellen sezerniert werden, T-Zellen zur Differenzierung und Proliferation anregen (Romagnani 1997, Mekori und Metcalfe 1999). Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, präsentieren Mastzellen, obwohl sie nicht zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen gehören, den T-Zellen Antigene und sie leiten die Adhäsion der T-Zelle an Fibroblasten ein (Meng et al. 1995).

Die Rolle der T-Zelle in der Pathogenese der Psoriasis ist eminent. Wie schon ausgeführt, lassen sich in der Epidermis und in der oberen Dermis CD3-positive T-Zellen nachweisen (Schön und Boehncke 2005). IFN- $\gamma$  sezernierende TH1-Zellen überwiegen gegenüber TH2-Zellen (Wilsmann-Theis et al. 2008). In den letzten Jahren konnte auch eine wesentliche Rolle der TH17-Zelle in der Pathogenese der Psoriasis gezeigt werden (Wilson et al. 2007).

Die läsionale Psoriasis-haut enthält dermale dendritische Zellen (CD11c+CD1c-), die TNF- $\alpha$  sezernieren und Stickstoffoxidsynthase produzieren (sog. Tip-DCs). Diese produzieren IL-23 und stimulieren damit die Aktivierung und Differenzierung von TH17-Zellen (Zaba et al. 2009). Es wird angenommen (Schön und Boehncke 2005), dass antigenpräsentierende Zellen (Langerhans-Zellen) in der Epidermis Autoantigene aufnehmen und verarbeiten, zu regionalen Lymphknoten wandern, wo sie mit T-Zellen in Kontakt treten, das Antigen präsentieren und die T-Zellen aktivieren. Die Präsentation des Antigens erfolgt über MHC und den T-Zell-Rezeptor

(TCR). Kostimulatorische Moleküle und ihre Liganden, wie z.B. CD2/CD58, CD28/CD80 oder CD28/CD86 vermitteln kostimulatorische Signale. Nach Aktivierung differenzieren die T-Zellen und wandern in Entzündungsregionen der Haut ein. In der Haut haben sie erneut Kontakt zum Antigen und sezernieren daraufhin proinflammatorische Zytokine. Außerdem treten sie über Zell-Zell-Kontakte und Mediatoren mit anderen Zellen in Kontakt. Ausführlicher ist dies bereits in Kapitel I. 1. dieser Arbeit bei der Pathogenese der Psoriasis beschrieben.

#### **I. 4. Zell-Zell-Kommunikation und Kostimulation**

Eine Interaktion von Mastzelle und T-Zelle wird – wie oben beschrieben – seit längerem vermutet. Wenig hingegen ist über die Proteine, Rezeptoren und Liganden, die diese Zell-Zell-Interaktion vermitteln, bekannt.

Antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen nehmen Antigen auf. Dendritische Zellen prozessieren das Antigen, reifen und wandern zu regionalen Lymphknoten, wo sie auf Ihrer Oberfläche mittels MHC-Klasse-II-Molekülen Antigenpeptide den CD4-T-Zellen präsentieren. Über MHC-Klasse-I-Moleküle werden auch CD8-T-Zellen aktiviert.

Die Aktivierung, Proliferation und klonale Expansion von T-Zellen bedarf dreier Signale. Zum Ersten der Interaktion von MHC-Klasse-II-Molekül und dem T-Zell-Rezeptor (TCR), zum Zweiten der Interaktion kostimulatorischer Moleküle mit ihren Liganden und zum Dritten löslicher Mediatoren (Sabat et al. 2007).

Solche kostimulatorischen Moleküle auf dendritischen Zellen sind beispielsweise CD86 (B7-2), CD80 (B7-1), ICOS-Ligand (synonym B7h, CD275), PD-L2 oder CD40 (Greenwald et al. 2005, Wang und Chen 2004), auf Makrophagen beispielsweise CD58. CD58 bindet an CD2 auf T-Zellen, CD80 und CD86 binden an CD28 auf T-Zellen, ICOS-Ligand bindet an ICOS-Rezeptor (synonym ICOS, CD278) auf T-Zellen. Zu den T-Zell-kostimulatorischen Molekülen gehört auch der ILA-Rezeptor, auf den im folgenden Kapitel ausführlich eingegangen wird.

## **I. 5. Bedeutung des ILA-Systems**

Zu den T-Zell-kostimulatorischen Molekülen gehört auch der ILA-Rezeptor, oft auch als ILA bezeichnet und synonym mit CD137 in der humanen CD-Klassifikation oder 4-1BB im Mausmodell. Dieses Molekül ist ein Mitglied der TNF-Rezeptoren-Familie und wird auf aktivierten CD4- und CD8-T-Zellen sowie NK-Zellen und Monozyten exprimiert (Schwarz et al. 1993, Schwarz et al. 1995, Wang et al. 1998, Kienzle und von Kempis 2000). Auch konnte eine Expression von ILA-Rezeptor auf folliculären dendritischen Zellen (FDC) des Lymphknotens nachgewiesen werden (Pauly et al. 2002, Lindstedt et al. 2003). Eine Expression von ILA-Rezeptor konnte auch auf Mausmastzellen nachgewiesen werden und durch Stimulation des IgE-Rezeptors FcεRI induziert werden (Nishimoto et al. 2005). Durch unsere Arbeit konnten wir auch eine Expression von ILA-Rezeptor auf humanen Mastzellen nachweisen (Lippert et al. 2007).

Die Signaltransduktion erfolgt bei ILA-Rezeptor und ILA-Ligand bidirektional wie auch bei anderen Mitgliedern der TNF- $\alpha$ -Familie (Zhou et al. 1995, Goodwin et al. 1993, Schwarz 2005). ILA-Rezeptor bindet an seinen Liganden, der auf B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Dendriten gefunden wurde (Wilcox et al. 2002, Lippert et al. 2008). Kostimulation über das ILA-System ist ein alternatives und synergistisches kostimulatorisches Signal zu CD28 (DeBenedette et al. 1997, Melero et al. 1998). Interaktionen zwischen ILA-Rezeptor und seinem Liganden sind bei der Antigenpräsentation und bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (TH1-vermittelte Antwort) beteiligt. Auf Monozyten wird durch Aktivierung des ILA-Liganden die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-6, IL-8, IL-12) induziert, ebenso wie die Expression des Adhäsionsmoleküls und Aktivierungsmarkers ICAM-1 und des IgG-Rezeptors Fc $\gamma$ RIII (CD16) (Langstein et al. 1998, Langstein et al. 2000, Laderach et al. 2003). Des Weiteren wird die Expression von M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) induziert, wodurch das Zellüberleben von Monozyten verlängert wird (Langstein und Schwarz 1999).

Bei T-Zellen reguliert der ILA-Rezeptor sowohl klonales Wachstum als auch das Überleben der T-Zellen (Cooper et al. 2002, Maus et al. 2002). Die Aktivierung des

ILA-Rezeptors auf T-Zellen verlängert deren Überleben. Die Aktivierung des ILA-Liganden hingegen, der ebenfalls auf der Oberfläche von T-Zellen vorhanden sein kann, vermittelt eine Apoptose der T-Zelle. Durch eine Aktivierung von ILA-Rezeptor auf T-Zellen wird die Proliferation von T-Zellen, besonders CD8-T-Zellen, begünstigt und Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-2 ausgeschüttet, was eine TH1-Antwort fördert (Shuford et al. 1997, Kim et al. 1998, DeBenedette et al. 1995, Bukczynski et al. 2003). Zusammenfassend sollte betont werden, dass die Ergebnisse dieser Studien darauf hinweisen, dass der ILA-Rezeptor in der Regulation der zytotoxischen T-Zell-Immunantwort eine zentrale Rolle spielt. In vivo konnte auch gezeigt werden, dass durch eine Aktivierung des ILA-Rezeptors die Erzeugung von zytotoxischen T-Zellen unterhalten und ihr Überleben begünstigt wurde (Takahashi et al. 1999, Tan et al. 1999, May et al. 2002).

Es soll noch einmal betont werden, dass durch eine Aktivierung des ILA-Rezeptors auf T-Zellen zwar deren Überleben verlängert wird. Die Aktivierung des ILA-Liganden hingegen, der ebenfalls auf der Oberfläche von T-Zellen vorhanden sein kann, löst eine Apoptose der T-Zelle aus (Michel et al. 1999, Schwarz et al. 1996).

An ILA-Rezeptor-defizienten Mäusen und auch an ILA-Ligand-defizienten Mäusen konnte eine zentrale Rolle der Kostimulation über das ILA-Rezeptor/Liganden-System bei der Expansion und Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten gezeigt werden (DeBenedette et al. 1999, Kwon et al. 2002, Tan et al. 1999). Zur Rolle von ILA-Rezeptor und ILA-Ligand bei der TH17-vermittelten Reaktion lagen bisher keine Erkenntnisse vor.

## **I. 6. Bedeutung des ICOS-Systems**

ICOS-Rezeptor ist ebenfalls ein kostimulatorisches Molekül und ein Mitglied der CD28-Rezeptor-Familie. Es ist bekannt, dass Mitglieder der CD28-Rezeptor-Familie eine zentrale Rolle in der Regulation der T-Zell-Antwort spielen (Beier et al. 2000, Greenwald et al. 2005, Rudd und Schneider 2003).

ICOS-Rezeptor wird nach Aktivierung von CD4-T-Zellen auf diesen exprimiert, ebenso auf aktivierten CD8-T-Zellen, nicht hingegen auf aktivierten B-Zellen,

Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen oder Thrombozyten (Yoshinaga et al. 1999, Coyle et al. 2000, Hutloff et al. 1999).

Der Partner des ICOS-Rezeptors ist ICOS-Ligand (synonym B7h, CD275). ICOS-Ligand wird auf B-Zellen und dendritischen Zellen stark exprimiert, weniger auf T-Zellen und Monozyten und Makrophagen, ebenso auf Endothelzellen und Keratinozyten (Greenwald et al. 2005, Kroczek et al. 2004, Khayyamian et al. 2002).

ICOS-Rezeptor-Aktivierung fördert die T-Zell-Proliferation, die Sekretion der Zytokine IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$  und IL-5 und die Hochregulation von Oberflächenmolekülen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von ICOS-Rezeptor eine wesentliche Rolle spielt in der Entwicklung von TH2-Zellen (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2000, Dong et al. 2001). Ferner reguliert ICOS-Rezeptor den CD40-Liganden auf T-Zellen hoch (Hutloff et al. 1999). Auch in ICOS-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ICOS-Rezeptor für die Produktion von IL-4 von essentieller Bedeutung ist (McAdam et al. 2000, Dong et al. 2001). Darüber ist erklärbar, dass ICOS-knock-out-Mäuse signifikant erniedrigte IgG- und IgE-Spiegel haben. Letztere sind wesentlich von IL4-produzierenden TH2-Zellen abhängig. Folglich spielt der ICOS-Rezeptor eine zentrale Rolle in der TH2-Antwort (Sperling und Bluestone 2001).

Es zeigte sich, dass das ICOS-System zwar die T-Zell-Antwort moduliert, sie alleine aber nicht aufrecht erhalten kann, da zwar die Bildung eines breiten Spektrums an Zytokinen, aber nicht das für die T-Zellproliferation wichtige IL-2 induziert wird (Dong et al. 2001).

Eine Untersuchung von Geschwistern mit einer ICOS-Defizienz zeigte bei nur einem der Geschwister neben einer Immundefizienz, eine rheumatoide Arthritis, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, eine interstitielle Pneumonie und auch eine Psoriasis. Bei beiden Geschwistern fand sich im Blut eine reduzierte Produktion von TH1-, TH2- und TH17-Zytokinen nach CD3/CD28-Kostimulation. Der T-Zell-Defekt betraf nicht nur CD4-, sondern auch CD8-T-Zellen (Takahashi et al. 2009). Wie beispielsweise auch in der akuten und chronischen Transplantatabstoßung gezeigt werden konnte, kann das ICOS-System also auch in der TH1-Antwort eine wichtige Rolle spielen (Sperling und Bluestone 2001, Smith et al. 2003, Ozkaynak et al. 2001, Khayyamian et al. 2002).

ICOS-defiziente Mäuse zeigen deutlich erniedrigte Spiegel sowohl von TH1- als auch TH2-Zytokinen, so dass angenommen werden kann, dass der ICOS-Rezeptor in der Modulation der Immunantwort eine zentrale Rolle einnimmt (Greenwald et al. 2002). Interessanterweise konnte aber auch gezeigt werden, dass der ICOS-Rezeptor die erst kürzlich beschriebene TH17-Zell-Antwort reguliert (Park et al. 2005, Schaefer et al. 2010).

Kürzlich konnte auch eine mögliche Beteiligung von ICOS-Rezeptor bei der T-Zell-Kostimulation in der Pustulosis palmaris et plantaris, die möglicherweise eine Sondervariante der Psoriasis darstellt, in vivo gezeigt werden (Sakiyama et al. 2008).

## **I. 7. Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die kostimulatorischen Moleküle ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor sowie ihre Liganden in der vornehmlich TH1-Zell-vermittelten Immunantwort in der Haut für die Interaktion von Mastzellen und T-Zellen von Bedeutung sind. Für unsere Untersuchung wählten wir die Psoriasis vulgaris, bei der die T-Zelle im Mittelpunkt der Pathogenese steht und bei der die Interaktion mit epithelialen und mesenchymalen Zellen erforscht werden kann. Bei der Psoriasis läuft nachgewiesenermaßen eine kombinierte T-Zell-Reaktion vom TH1- und TH17-Typ und keine TH2-Reaktion in der Haut ab (Sabat et al. 2007, Schön und Boehncke 2005, Nestle et al. 2009, Lowes et al. 2007, Fitch et al. 2007).

Wie bereits in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellt, beinhaltet die Pathogenese der Psoriasis ein komplexes Zusammenspiel von unterschiedlichen Zellen und Zytokinen. Im Wesentlichen sind T-Zellen und dendritische Zellen zu nennen sowie die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 und IL-22. Genetische Faktoren und Umweltfaktoren spielen eine Rolle. Die Vermehrung der T-Zellen in der Haut ist wahrscheinlich eines der zentralen Ereignisse in der Pathogenese der Psoriasis. Als pathogenetisch für die chronische Phase wesentlich werden TH1-Zellen mit ihrer IFN- $\gamma$ -Produktion betrachtet. Die Kommunikation der T-Zelle mit anderen Zelltypen, u.a. dendritischen Zellen und Keratinozyten sowie Mastzellen, initiiert und unterhält die Entzündung und ist damit von wesentlichem Interesse in laufenden

Untersuchungen.

Mögliche Kandidaten für die Zell-Zell-Kommunikation bei der Psoriasis sind das ILA-System sowie das ICOS-System. In der vorliegenden Arbeit wurden daher immunhistochemische Untersuchungen zur Proteinexpression von ILA-Rezeptor, ICOS-Rezeptor und ihrer Liganden auf Mastzellen und T-Zellen an Gewebeschnitten von befallener Haut aus der Psoriasisplaque und von unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten durchgeführt. Zur Kontrolle wurde auch gesunde menschliche Haut untersucht.

Die bekannten Grundlagen der Pathogenese der Psoriasis ließen eine Aktivität von Immunzellen in der Haut des Psoriasis-erkrankten vermuten.

Aufgrund der Bedeutung von TH1- und TH17-Zellen in der Psoriasisplaque war zu vermuten, dass sich in konventionellen Färbungen eine vermehrte Expression insbesondere des ILA-Rezeptor-/Ligandensystems und weniger des ICOS-Rezeptor-/Ligandensystems auf immunrelevanten Zellen findet. Darüber hinaus war bekannt und aufgrund des bekannten Köbner-Phänomens zu vermuten, dass auch die unbeefallene Haut des Psoriasis-erkrankten bereits funktionelle Veränderungen aufweisen könnte. Folglich vermuteten wir auch in der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten Veränderungen der von uns untersuchten Moleküle. Das Köbner-Phänomen zeigt, dass sich nicht-läsionale Haut durch mechanisches Trauma in eine Psoriasisläsion umwandeln lässt. Bekanntlich können Mastzellen durch mechanische Irritation aktiviert werden. Folglich war zu vermuten, dass Mastzellen auch in der unbeefallenen Haut aktiviert sein könnten. Bekannt war auch, dass die Mastzelle mit der T-Zelle interagiert. Folglich war die Mastzelle neben der T-Zelle ein guter Kandidat für eine Zell-Zell-Kommunikation auch über das ILA-System. Da bekannt war, dass das ILA-System in der TH1-vermittelten Entzündungsreaktion von wesentlicher Relevanz ist, erwarteten wir eine signifikant höhere Expression von ILA-Rezeptor und seinem Liganden. Die Bedeutung des ICOS-Systems wurde bei Beginn unserer Studien noch in der TH2-vermittelten Entzündungsreaktion gesehen, so dass wir zu Beginn keine signifikanten Unterschiede in der Expression von ICOS-Rezeptor und seinem Liganden zwischen der Haut gesunder Probanden und Psoriasis-erkrankten erwarteten. Zwischenzeitlich erschienene Publikationen wiesen

jedoch auch auf eine Relevanz des ICOS-Systems auch in TH1/TH17-vermittelten Entzündungsreaktionen hin, so dass daraufhin nicht auszuschließen war, dass auch ICOS-Rezeptor und sein Ligand in der Psoriasis auf T-Zellen vermehrt exprimiert werden könnte.

## II. Methoden

### II. 1. Auswahl der Psoriasis-erkrankten

Im Rahmen der Spezialsprechstunden der Hautklinik der Universität Göttingen wurden fünf an einer gesicherten, chronisch-stationären Psoriasis vulgaris erkrankte Individuen ausgewählt. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in der Tabelle 1 dargestellt.

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Erwachsene Erkrankte mit der gesicherten Diagnose einer Psoriasis vulgaris vom Plaquetyp	Systemische immunsuppressive Therapie einschließlich oraler Kortikosteroide, Einnahme von Cyclosporin A u.a. innerhalb von 4 Wochen vor Studienbeginn
Erkrankte im Alter von 18 bis 70 Jahren	Topische Behandlung der Hauterkrankung mit Kortikosteroiden innerhalb von 2 Wochen vor Studienbeginn
	Schwangere oder stillende Patientinnen
	Maligne oder andere systemische entzündliche Erkrankungen
	Teilnahme an anderen klinischen oder nicht-klinischen Studien zum Zeitpunkt dieser Studie oder in den vorhergehenden oder folgenden 6 Wochen

**Tab. 1: Ein- und Ausschlusskriterien.** Ein- und Ausschlusskriterien für die Auswahl von fünf an einer gesicherten, chronisch-stationären Psoriasis vulgaris erkrankten Personen, denen eine Hautbiopsie jeweils aus befallener und unbefallener Haut entnommen wurde, sowie von fünf Personen der gesunden Kontrollgruppe.

Entsprechend dem Ethikvotum 17/3/00 der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen wurden die Erkrankten detailliert aufgeklärt und haben eine Einwilligungserklärung zur Biopsieentnahme und zur Verwendung der Hautbiopsie zu wissenschaftlichen Zwecken unterschrieben. Die Personen, die zur Probenentnahme bereit waren und in die vorliegende Studie eingeschlossen wurden, waren männlich (n=5) und zwischen 30 und 44 Jahren alt (im Mittel 37,8 Jahre).

In Lokalanästhesie wurde eine Hautstanze mit einem Durchmesser von 4 mm aus einer chronisch-stationären Plaque aus der Mitte zwischen Zentrum und Rand der Hautläsion entnommen. Eine weitere 4mm-Hautstanze wurde aus unveränderter

Haut des Erkrankten entnommen. Beide Stenzen wurden jeweils im Rumpfbereich entnommen. Das Material wurde in Acetonlösung konserviert und anonymisiert an den Untersucher weitergeleitet.

## **II. 2. Auswahl der gesunden Kontrollgruppe**

Im Rahmen von Mamma-Reduktionsplastiken wurden aus den operativ entfernten Hautstreifen 4mm-Hautstanzen entnommen. Diese Hautstanzen wurden ebenfalls mittels Aceton fixiert. Für die Personen aus der Kontrollgruppe galten, analog zu den Psoriasis-erkrankten, die o.g. Ausschlusskriterien. Auch die 5 Personen (n=5) aus der Kontrollgruppe mussten das Einschlusskriterium „Alter zwischen 18 und 70 Jahren“ erfüllen.

## **II. 3. Einbettung der Hautstanzen in AMeX und Anfertigung von Gewebeschnitten**

Für die Durchführung der im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen habe ich in unserem Labor die Einbettungsmethode nach AMeX (Aceton-Methylbenzoat-Xylol) und auch die immunhistochemischen Färbemethoden etabliert. Dies waren wesentliche Bestandteile der vorliegenden Arbeit, und methodische Aspekte werden deshalb in der Diskussion ausführlicher besprochen.

Die in Acetonlösung fixierten Hautstanzen wurden nach 24 Stunden Dehydratation in Aceton für 30 Minuten in Methylbenzoat verbracht, um sie schnittfähig zu machen. Dann wurde das Material 3 x 15 Minuten in Xylol inkubiert. Mittels Unterdruck, der durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, wurde gewährleistet, dass das Xylol das Material durchdrang. Das Xylol wurde jeweils erneuert, um Verunreinigungen mit Aceton und Methylbenzoat zu reduzieren. Schließlich wurden die Stenzen 2 x 60 Minuten in Paraffin gebadet, eingebettet und in Blöcke gegossen.

## **II. 4. Entparaffinierung von Gewebeschnitten**

Mikrotomschnitte (3 µm) wurden für 2 x 10 Minuten in Xylol und anschließend 1 Minute in Aceton gebadet. Dann wurden sie mit elektrolytfreiem Wasser gespült und

für 5 Minuten mit PBS („phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen.

## **II. 5. Primärantikörper**

Für die immunhistologische Charakterisierung wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Primärantikörper eingesetzt:

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Tryptase (Mastzellen)	AA1	Maus	IgG1 $\kappa$	1:300	DAKO, Hamburg	Walls et al. 1990
CD2 (T-/NK-Zellen)	MT910	Maus	IgG1 $\kappa$	1:50	DAKO, Hamburg	Hoffmann et al. 1989
Makrophagen/ Monozyten	KiM1P	Maus	IgG1	1:1000	Prof. Parwaresh, Institut für Histo- pathologie, Universität Kiel	Radzun et al. 1991
Fascin/ p55 (dendritische Zellen)	55K-2	Maus	IgG1	1:100	DAKO, Hamburg	Mosialos et al. 1996, Pinkus et al. 1997
ILA-Rezeptor	BBK-2	Maus	IgG1	1:50	Biosource, Solingen	Lee et al. 2002
ILA-Ligand	polyklonal	Kaninchen	polyklonal	1:100	Chemicon, USA	Yoshida et al. 2003
ICOS- Rezeptor	F44	Maus	IgG1	1:50	Prof. KroczeK, RKI, Berlin	Khayyamian et al. 2002
ICOS-Ligand	HIL-93	Maus	IgG1	1:250	Prof. KroczeK, RKI, Berlin	Witsch et al. 2002

**Tab. 2: Primärantikörper zur immunhistologischen Charakterisierung.**

Die Antikörper gegen ICOS-Rezeptor und ICOS-Ligand wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. KroczeK, Robert-Koch-Institut Berlin, und Antikörper gegen Makrophagen/ Monozyten (Klon KiM1P, erfasst alle Differenzierungsformen)

von Prof. Dr. Parwaresh, Institut für Histopathologie der Universität Kiel, zur Verfügung gestellt.

## II. 6. Sekundärantikörper, Chromogene und Fluoreszenzstoffe

Für den Nachweis gebundener Primärantikörper wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Sekundärantikörper und sekundären Reagenzien verwendet:

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
Link™	Maus/ Kaninchen	Ziege	Biotin	ready-to-use	DAKO, Hamburg
Envision™	Maus/ Kaninchen	Ziege	HRP	ready-to-use	DAKO, Hamburg
Streptavidin HRP („horse raddish Peroxidase“, Meer- rettichperoxidase)	Biotin		HRP	1:100	DAKO, Hamburg
Ziege-anti-Maus-Fab- Fragmente	Maus	Ziege	keine	1:25 in TNB- Puffer	DAKO, Hamburg
AEC (3-Amino-9- Ethylcarbazol)- Chromogen	HRP		Chromogen	Ansatz laut Hersteller	Biogenex, USA
Ziege-anti-Maus Cy5 (Indodicarbocyanin)	Maus	Ziege	Cy5 (Indodi- carbocyanin)	1:500	DAKO, Hamburg
Tyramid biotinyliert	HRP		Biotin	1:50 in Diluent	Perkin Elmer, Darmstadt- Weiterstadt
Tyramid Cy3 (Indocarbocyanin)	HRP		Cy3 (Indo- carbocyanin)	1:50 in Diluent	Perkin Elmer, Darmstadt- Weiterstadt
Tyramid Cy5 (Indodi- carbocyanin)	HRP		Cy5 (Indodi- carbocyanin)	1:50 in Diluent	Perkin Elmer, Darmstadt- Weiterstadt

**Tab. 3: Sekundärantikörper, Chromogene und Fluoreszenzstoffe.**

Die Sekundärantikörper und Chromogene dienen dem Nachweis des primären Antikörpers, welcher an die Zielstruktur im Gewebe bindet. Durch diese indirekte Färbemethode kann die Bindung des unkonjugierten Primärantikörpers sichtbar gemacht werden. Wir haben in dieser Arbeit verschiedene Detektionssysteme benutzt. Auf die Auswahl dieser Systeme wird in der Diskussion näher eingegangen.

Eines der gebräuchlichsten Systeme nutzt die starke Bindungsfähigkeit zwischen Streptavidin, ein von den Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziertes Protein, mit vier Molekülen Biotin. Demgegenüber nutzt das System der Tyramid-Verstärkung die Reaktion zwischen Tyramid und HRP („horse raddish peroxidase“, Meerrettichperoxidase). Konventionelle immunhistochemische Färbungen wurden mit dem Chromogen AEC (AEC = 3-Amino-9-Ethylcarbazol) durchgeführt. Die Peroxidase, in unserem Fall HRP, bewirkt eine Oxidation des farblosen Substrates AEC. Durch diese Reaktion entsteht ein rötliches Produkt. Damit es nicht zu unspezifischen Reaktionen kommt, ist es wichtig, die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen zu blockieren. Diese Methoden werden in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt.

## **II. 7. Konventionelle immunhistochemische Färbung ohne Tyramid-Verstärkung**

Zur Anfertigung konventioneller immunhistochemischer Färbungen von Mastzellen (Marker: Tryptase), T-Zellen (Marker: CD2) und ILA-Ligand wurde das im Folgenden beschriebene Protokoll erarbeitet. Als Negativkontrolle diente PBS unter Weglassung der Primärantikörper. Eine schematische Übersicht über das Färbeprotokoll sowie die Negativkontrollen bietet Tabelle 4.

Mit 0,3%iger Wasserstoffperoxid( $H_2O_2$ )-Lösung wurde über eine 10-minütige Inkubation bei Zimmertemperatur die endogene Peroxidase blockiert. Über 30 Minuten wurden mit Ziegenserum unspezifische Bindungen blockiert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach diesen Blockierungsschritten wurde der Gewebeschnitt mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C über 12 Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurde 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, ebenso zwischen den folgenden Schritten. Dann wurde mit DAKO-Link, ein biotinyliertes Ziege-anti-Maus/Kaninchen-Polymer, über 30 Minuten ebenfalls in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Streptavidin HRP, ebenfalls über 30 Minuten, in feuchter Kammer inkubiert. Das Streptavidin bindet an das Biotin des Brückenantikörpers DAKO-Link. Über das HRP wird eine Bindung des folgenden Chromogens ermöglicht.

Das AEC-Chromogen wurde entsprechend dem von Herstellerseite empfohlenen Ansatz hergestellt, auf den Schnitt aufgebracht und unter Sicht gestoppt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit elektrolytfreiem Wasser gespült, dann erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun, bevor mit Leitungswasser gespült wurde. Dann wurden die Schnitte mit Aquamount einbettet.

<b>Blockierung</b> 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ziegen Serum	Primärantikörper	<b>Färbung</b> DAKO-Link Streptavidin HRP AEC-Chromogen
	Negativkontrolle	

**Tab. 4: Schematische Übersicht des Färbeprotokolls und der Kontrollen für die konventionelle Immunhistochemie ohne Tyramid-Verstärkung.** Als Primärantikörper wurde anti-Tryptase, anti-CD2, anti-KiM1P, anti-p55 oder anti-ILA-Ligand eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, die ohne Primärantikörper ausschließlich mit PBS inkubiert wurden. Es wurde eine Kontrolle zum Ausschluss unzureichender Blockierungen und unspezifischer Bindungen mitgeführt.

## **II. 8. Konventionelle immunhistochemische Färbung mit Tyramid-Verstärkung**

Konventionelle immunhistochemische Färbungen von ILA-Rezeptor, ICOS-Rezeptor und ICOS-Ligand wurden mit einer Verstärkung durch das „Tyramide Signal Amplification (TSA) Biotin System“ von Perkin Elmer durchgeführt. Auf die Methode der Tyramidverstärkung wird in der Diskussion näher eingegangen.

Hierfür wurde das folgende Protokoll erarbeitet und etabliert, womit wir gute Färbeergebnisse an AMeX-Material erzielen. Als Negativkontrolle diente PBS unter Weglassung der Primärantikörper. Eine schematische Übersicht über das Färbeprotokoll sowie die Negativkontrollen bietet Tabelle 5.

Zunächst wurden die notwendigen Blockierungsschritte durchgeführt, die sich geringfügig von der Färbung ohne Tyramid-System unterschieden. Es wurde zunächst mit 0,3%iger  $H_2O_2$ -Lösung über 10 Minuten die endogene Peroxidase blockiert. Über 30 Minuten wurden mit dem zum TSA-System von Perkin Elmer gehörenden TNB-Puffer (TNB = Tris-NaCl-Blockierung) unspezifische Bindungen blockiert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und auch anschließend noch einmal für 2 x 5 Minuten. Nach diesen Blockierungsschritten wurden die Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C über 12 Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurde 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, ebenso zwischen den folgenden Schritten. Dann wurde mit dem DAKO-Link über 30 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Streptavidin HRP über 30 Minuten. An die HRP bindet das biotinylierte Tyramid, das 10 Minuten inkubiert wurde. Erneut wurde mit Streptavidin HRP über 30 Minuten inkubiert, woran dann das AEC-Chromogen binden konnte. Färbung, Kernfärbung und Einbettung erfolgten wie bereits erwähnt.

<b>Blockierung</b> 0,3% $H_2O_2$ TNB-Puffer	Primärantikörper	<b>Färbung</b> DAKO-Link Streptavidin HRP biotinyliertes Tyramid
	Negativkontrolle	Streptavidin HRP AEC-Chromogen

**Tab. 5: Schematische Übersicht des Färbeprotokolls und der Kontrollen für die konventionelle Immunhistochemie mit Tyramid-Verstärkung.** Als Primärantikörper wurde anti-ILA-Rezeptor, anti-ICOS-Rezeptor oder anti-ICOS-Ligand eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, die ohne Primärantikörper ausschließlich mit PBS inkubiert wurden. Es wurde eine Kontrolle zum Ausschluss unzureichender Blockierungen und unspezifischer Bindungen mitgeführt.

## **II. 9. Doppelimmunfluoreszenz mit einem Tyramid-Verstärkungssystem**

Für die Doppelimmunfluoreszenz wurden die Primärantikörper gegen ILA-Rezeptor, ICOS-Rezeptor, ILA-Ligand und ICOS-Ligand mittels eines Tyramidsystems verstärkt. Hierfür wurde das folgende Protokoll erarbeitet und etabliert, womit gute Ergebnisse in der Doppelimmunfluoreszenz an AMeX-Schnitten erreicht werden

konnten. Eine schematische Übersicht über das Färbeprotokoll sowie die Negativkontrollen bietet Tabelle 6.

Wie auch in der konventionellen Immunhistochemie mit Tyramid-Verstärkung erfolgten die Blockierungsschritte nach Deparaffinierung mit 0,3%iger  $H_2O_2$ -Lösung und TNB-Puffer. Anschließend wurde der erste Primärantikörper (anti-ILA-Rezeptor, anti-ICOS-Rezeptor, anti-ILA-Ligand, anti-ICOS-Ligand) über 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Dieser erste Primärantikörper wurde mit DAKO-Envision, einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus/Kaninchen-Polymer, durch 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer detektiert. Anschließend wurde das Signal durch Inkubation mit einem Indodicarbocyanin(Cy5)-gekoppelten Tyramid sichtbar gemacht.

Vor der Inkubation und Markierung des zweiten Primärantikörpers (anti-Tryptase, anti-KiM1P, anti-p55), der aus der Maus stammte, war es nötig, den ersten Primärantikörper (anti-ILA-Rezeptor, anti-ICOS-Rezeptor, anti-ICOS-Ligand), der ebenfalls aus der Maus stammte, zu blockieren. Dieser Blockierungsschritt erfolgte mit Ziege-anti-Maus-Fab-Fragmenten in TNB-Puffer.

Anschließend wurde der Schnitt mit dem zweiten Primärantikörper (anti-Tryptase, anti-KiM1P, anti-p55) über 12 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Signal wurde durch einen Indodicarbocyanin(Cy3)-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper dargestellt, mit dem die Schnitte über 60 Minuten inkubiert wurden.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Abschließend wurde in Fluoromount eingebettet. Als Kontrollen dienten Schnitte, auf denen PBS ohne Primärantikörper aufgebracht worden war.

<b>Blockierung</b> 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TNB-Puffer	1. Primärantikörper	<b>Färbung</b> DAKO-Envision Tyramid Cy5	<b>Blockierung</b> Ziege-anti- Maus-Fab TNB-Puffer	2. Primärantikörper	<b>Färbung</b> Ziege-anti- Maus Cy3
	1. Primärantikörper			Negativkontrolle	
	Negativkontrolle			2. Primärantikörper	
	Negativkontrolle			Negativkontrolle	

**Tab. 6: Schematische Übersicht des Färbeprotokolls und der Kontrollen für die Doppelimmunfluoreszenz mit einem Tyramid-Verstärkungssystem.** Als 1. Primärantikörper wurde anti-ILA-Rezeptor, anti-ILA-Ligand, anti-ICOS-Rezeptor oder anti-ICOS-Ligand eingesetzt. Als 2. Primärantikörper wurde anti-Tryptase, anti-KiM1P oder anti-p55 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, die ohne Primärantikörper ausschließlich mit PBS inkubiert wurden. Es wurden 3 unterschiedliche Kontrollen zum Ausschluss unzureichender Blockierungen und unspezifischer Bindungen mitgeführt.

## II. 10. Doppelimmunfluoreszenz mit zwei Tyramid-Verstärkungssystemen

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass das CD2-Signal an unserem AMeX-Material in der unverstärkten Fluoreszenz nicht kräftig genug war, um eine sichere Aussage in der Doppelfluoreszenz zu ermöglichen. Folglich mussten wir für diese Untersuchung die Signale beider Primärantikörper mit TSA-Systemen verstärken. Eine schematische Übersicht über das Färbeprotokoll sowie die Negativkontrollen bietet Tabelle 7.

Deparaffinierung und Blockierung erfolgten, wie bereits erwähnt, mit 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und TNB-Puffer. Anschließend wurde mit dem ersten Primärantikörper (anti-CD2) über 12 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Dieser Primärantikörper wurde mit dem erwähnten (HRP-gekoppelten) DAKO-Envision-System detektiert, mit dem 30 Minuten inkubiert wurde. Anschließend wurde dieses Signal durch Cy3-gekoppeltes Tyramid sichtbar gemacht.

Bevor der zweite Primärantikörper (anti-ILA-Rezeptor, anti-ICOS-Rezeptor, anti-ILA-Ligand, anti-ICOS-Ligand) auf den Schnitt aufgetragen wurde, musste zunächst der erste Primärantikörper (anti-CD2) blockiert werden, weil das Detektionssystem DAKO-Envision, das in beiden Schritten verwendet wurde, sowohl Maus- als auch Kaninchen-Antigene erkennt. Dieser Blockierungsschritt erfolgte, wie bereits schon einmal erwähnt, mit Ziege-anti-Maus-Fab-Fragmenten in TNB-Puffer. Zudem musste die Peroxidase aus dem ersten Schritt blockiert werden, damit in der Folge aufgetragenes Tyramid Cy5 nicht an vorbestehende Bindungsstellen band. Dies erfolgte wiederum mit 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 10 Minuten.

Anschließend wurde der zweite Primärantikörper (anti-ILA-Rezeptor, anti-ICOS-Rezeptor, anti-ILA-Ligand, anti-ICOS-Ligand) über 12 Stunden bei 4°C in feuchter Kammer inkubiert. Wiederum wurde dieser Primärantikörper mit dem (HRP-gekoppelten) DAKO-Envision-System detektiert (30 Minuten Inkubation). Anschließend wurde das Signal durch Cy5-gekoppeltes Tyramid sichtbar gemacht.

Zwischen diesen Schritten wurde jeweils 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden ebenfalls in Fluoromount eingebettet. Bei sämtlichen Schritten wurden, unter Auslassen des Primärantikörpers, PBS-Kontrollen mitgeführt.

<b>Blockierung</b> 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TNB-Puffer	1. Primärantikörper	<b>Färbung</b> DAKO-Envision Tyramid Cy3	<b>Blockierung</b> Ziege-anti- Maus-Fab TNB-Puffer 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2. Primärantikörper	<b>Färbung</b> DAKO-Envision Tyramid Cy5
	1. Primärantikörper			Negativkontrolle	
	Negativkontrolle			2. Primärantikörper	
	Negativkontrolle			Negativkontrolle	

**Tab. 7: Schematische Übersicht des Färbeprotokolls und der Kontrollen für die Doppelimmunfluoreszenz mit einem Tyramid-Verstärkungssystem.** Als 1. Primärantikörper wurde anti-CD2 eingesetzt. Als 2. Primärantikörper wurde anti-ILA-Rezeptor, anti-ILA-Ligand, anti-ICOS-Rezeptor oder anti-ICOS-Ligand eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden bei jeder Färbung Schnitte mitgeführt, die ohne Primärantikörper ausschließlich mit PBS inkubiert wurden. Es wurden 3 unterschiedliche Kontrollen zum Ausschluss unzureichender Blockierungen und unspezifischer Bindungen mitgeführt.

## II. 11. Konfokale Mikroskopie und Quantifizierung

Zur Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzen wurde ein konfokales Laser-Mikroskop (Leica TCS NT) mit Krypton/Argon-Laser verwendet, das uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Radzun, Zentrum Pathologie der Universitätsklinik Göttingen, zur Mitbenutzung für unsere Messungen überlassen wurde. Hierdurch wurde insbesondere die Auswertung der Cy5-Fluoreszenzen ermöglicht.

In 400facher Vergrößerung erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzfärbungen in getrennten Kanälen für Indocarbocyanin (Cy3) bzw. Indodicarbocyanin (Cy5). Zu diesem Zweck wurde der Schnitt im Bereich von Epidermis und Subkutis meanderförmig durchfahren. Die so gewonnenen Aufnahmen wurden überlagert und die dargestellten positiven Zellen bezüglich einer Koexpression evaluiert. Es wurde die Anzahl der gezählten einfach- und doppelt-positiven Zellen notiert.

Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze. Es wurden dabei sämtliche Zellen gezählt, die sich mit den jeweiligen Zellmarkern darstellten. Die Tatsache, dass die Größe der Schnitte sich technisch bedingt von Schnitt zu Schnitt unterschieden, wurde berücksichtigt, da in die statische Auswertung ausschließlich prozentuale Verhältnisse der Expression der untersuchten Rezeptoren und Liganden auf den jeweiligen Zelltypen eingingen.

## **II. 12. Auswertung und Quantifizierung**

Anhand der Bilder, die kanalgetrennt mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurden, wurde die Expression von ILA-Rezeptor und ILA-Ligand sowie ICOS-Rezeptor und ICOS-Ligand auf Mastzellen (Tryptase-positiv), T-Zellen (CD2-positiv) und teils auch Makrophagen (KiM1P-positiv) und Dendriten (p55-positiv) untersucht. Es entstand jeweils ein Bild aus zwei Kanälen, einmal aus dem Wellenlängenbereich zur Untersuchung der Cy3-Fluoreszenz (rot) und einmal der Cy5-Fluoreszenz (grün). An sich ist die Cy5-Fluoreszenz für das menschliche Auge nicht wahrnehmbar. Cy5 wurde mittels Krypton-Argon-Laser angeregt und am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop computergestützt analysiert und grün dargestellt. Auf die Eigenschaften und Vozüge dieser Fluoreszenzfarbstoffe wird in der Diskussion näher eingegangen. Im Anschluss wurden diese beiden Bilder überlagert, so dass das rote Cy3- und das grüne Cy5-Signal überlagert erschienen. Bei einer Übereinstimmung resultierte ein gelbes Signal. Anhand dieser Bilder wurden dann einfach positive Zellen und doppelt positive Zellen gezählt.

## **II. 13. Statistik**

Gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Brunner und Dr. Konietschke, Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen, erfolgte die statistische Auswertung.

In die statistische Auswertung floss die Anzahl der gezählten ILA-Rezeptor-positiven, ILA-Ligand-positiven, ICOS-Rezeptor-positiven und ICOS-Ligand-positiven Mastzellen (Tryptase-positiv), T-Zellen (CD2-positiv), Makrophagen (KiM1P-positiv) und Dendriten (p55-positiv) ein. Es wurde jeweils der prozentuale Anteil der positiven Zellen ermittelt. So wurde vermieden, dass die ausgewertete Fläche einen Einfluss

auf das Untersuchungsergebnis hatte. Die Fläche war schließlich abhängig von der Größe der Stanze (4 mm Durchmesser) und des angefertigten Schnittes sowie von der Auswertung am konfokalen Mikroskop, bei dem nie exakt in gleicher Form durch den Schnitt mäandert werden konnte.

So wurde der Anteil positiver Zellen ermittelt und der arithmetische Mittelwert sowie der Median gebildet (Lange und Bender 2001 a). Der arithmetische Mittelwert stellt den „Durchschnitt“, also die Summe der Beobachtungen geteilt durch die Zahl der Beobachtungen, dar. Dem hingegen stellt der Median den Wert der sortierten Stichprobe dar, der in der Mitte zweier gleich großer Hälften liegt. Anders als der Mittelwert wird der Median daher von extremen Werten, sog. Ausreißern, kaum beeinflusst.

Grafisch dargestellt wurden unsere Ergebnisse einerseits in Histogrammen (Lange und Bender 2001 d), in denen die Häufigkeiten unserer Messungen als Rechtecke abgebildet sind. Andererseits wurde die Darstellung in Box Plots (Lange und Bender 2001 b) gewählt. In den Box Plots ist der Median abzulesen sowie das 25%-Quantil und 75%-Quantil. Sog. „Whiskers“ markieren den Bereich bis zum größten bzw. kleinsten Wert aus den Daten. In dieser Darstellung sind dann keine Ausreißer mehr erkennbar, da die Box inklusive Whisker die gesamte Spannweite der Daten abdeckt.

Das 25%-Quantil markiert den Punkt, unterhalb dessen 25% der Werte liegen. Das 75%-Quantil markiert den Punkt, an dem 25% der Werte oberhalb dessen liegen. Zwischen 25%- und 75%-Quantil liegt die Hälfte der beobachteten Werte. Für die Bestimmung von Quantilen ist es erforderlich, die Werte vom kleinsten zum größten Wert zu sortieren.

In den Tabellen wurde zudem die Varianz (Lange und Bender 2001 c) berechnet. Die Varianz ist das Maß, welches die Streuung der Messgrößen beschreibt. Sie wird berechnet, indem man die Differenz jedes Messwertes vom Mittelwert quadriert, addiert und durch den um eins verminderten Stichprobenumfang ( $n-1$ ) dividiert. Dieses Variabilitätsmaß soll eine Vorstellung vermitteln, wie stark die einzelnen Werte streuen, d.h. wie repräsentativ der Mittelwert ist. Da die Varianz aufgrund der

Quadratur eine andere Dimension als der Mittelwert hat, ist eine grafische Darstellung in diesem Zusammenhang nicht möglich.

Um Rückschlüsse auf die statistische Signifikanz zu ziehen, berechneten wir daher das Konfidenzintervall (Bender und Lange 2001 b), welches ebenfalls grafisch um den Mittelwert dargestellt wurde. Das Konfidenzintervall ist der Unsicherheitsbereich für die Schätzung des Mittelwertes unserer Stichprobe. Das Ergebnis der Schätzung des Mittelwertes ist abhängig von der Stichprobe und weist bekanntlich eine Zufallsschwankung auf. Zur Berechnung unseres Konfidenzintervalls wählten wir eine Überdeckungswahrscheinlichkeit von 95%. Das 95%-Konfidenzintervall enthält den theoretisch unbekanntem Mittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. Das Konfidenzintervall liefert die Information in der gleichen Skala wie der zu untersuchende Wert, in unserem Fall in Prozent der positiven Zellen, so dass eine grafische Darstellung um den Mittelwert möglich ist. Die Breite des Konfidenzintervalls ist abhängig von den Stichprobenumfängen ( $n$ ) und den Standardabweichungen. Die Standardabweichung ist die Wurzel der Varianz. Ein Vorteil des Konfidenzintervalls gegenüber der Punktschätzung des Mittelwertes ist, dass man an ihm die Signifikanz ablesen kann. Ein zu breites Vertrauensintervall weist auf einen zu geringen Stichprobenumfang hin. Entweder ist die Stichprobe tatsächlich klein oder das untersuchte Phänomen ist so variabel, dass nur durch eine unrealistisch große Stichprobe ein Konfidenzintervall von akzeptabler Breite erreicht werden könnte.

Zur Frage der Signifikanz unserer Ergebnisse führten wir einen statistischen Signifikanztest durch. Wir nahmen dabei gleiche Varianzen, also eine sogenannte Compound-Symmetry-Kovarianzstruktur an. Mit einem t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben wurde die Signifikanz untersucht. Das Ergebnis dieses Signifikanztestes ist der p-Wert (Bender und Lange 2001 a). Mit Hilfe dieses Signifikanztestes kann man formulierte Hypothesen überprüfen. Es wird entweder eine „Nullhypothese“ mit der Formulierung der Gleichheit (kein Effekt) oder die Alternativhypothese mit der Formulierung eines Unterschiedes (Effekt) aufgestellt. Beim t-Test wird die Differenz zweier Mittelwerte auf den Standardfehler dieser Differenz normiert. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass – angenommen, die Nullhypothese sei wahr – die Statistik den beobachteten oder einen extremeren Wert

annimmt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit klein ist, so spricht dies gegen die Nullhypothese. Vor Datenerhebung wird eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt. Die Höhe des p-Wertes ist abhängig von erstens der Stärke des Effektes, zweitens der Variabilität der Daten und drittens der Größe der Stichprobe. Bei kleinen Stichproben ist es schwerer, sehr kleine p-Werte und damit statistische Signifikanz zu erreichen, obwohl der Effekt eventuell deutlich und möglicherweise bedeutend ist.

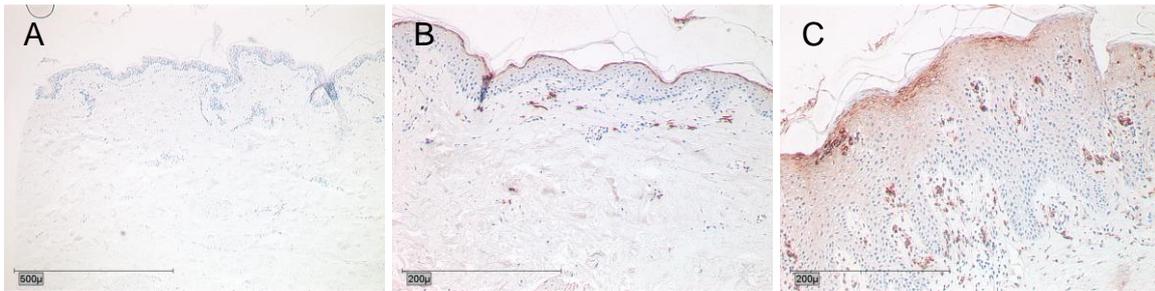
### III. Ergebnisse

#### III. 1. Expression von ILA-Rezeptor beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Da bis dato über die Expression des T-Zell-kostimulatorischen Moleküls ILA-Rezeptor und seines Liganden in der normalen humanen Haut und in der Entzündungsreaktion der humanen Haut nichts bekannt war, untersuchten wir beide mittels konventioneller immunhistochemischer Färbungen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers an Gewebeschnitten von Gesunden und von Psoriasis-erkrankten in befallener und unbefallener Haut. Wir wählten die Psoriasis als Modell einer Erkrankung, bei der TH1-Zellen eine wichtige Rolle spielen, da aus in-vitro-Untersuchungen in der Literatur bekannt war, dass eine Aktivierung des ILA-Rezeptors zu einem Priming von TH1-Zellen führen kann.

Wir haben die Gewebeschnitte von 5 gesunden Probanden (Gruppe C) sowie von 5 Psoriasis-erkrankten untersucht, denen Stanzbiopsien jeweils aus klinisch unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) entnommen worden waren.

Exemplarisch für diese konventionellen immunhistochemischen Färbungen zeigen wir in der folgenden Abbildung 1, dass sich in der Haut von 5 gesunden Probanden keine Expression des ILA-Rezeptors fand. Hingegen fanden wir in der unbefallenen Haut und auch in der befallenen Haut von 5 Psoriasis-erkrankten eine deutliche Expression von ILA-Rezeptor.



**Abb. 1: Expression von ILA-Rezeptor im Gewebeschnitt von gesunden Probanden (A), unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten (B) und in der Psoriasisplaque (C).** A) Im Gewebeschnitt eines gesunden Probanden findet sich keine Expression des ILA-Rezeptors. B) In der unbeefallenen Haut eines Psoriasis-erkrankten ist eine Expression des ILA-Rezeptors auf Zellen in der Dermis erkennbar. C) In der Psoriasisplaque sieht man eine deutlich heraufgesetzte Expression des ILA-Rezeptors. A-C) Diese Untersuchungen wurden an jeweils 5 gesunden und 5 erkrankten Individuen durchgeführt und die Ergebnisse ließen sich an allen Proben reproduzieren. In die Dermis infiltrierende Entzündungszellen sind ILA-Rezeptor-positiv, die Epidermis färbt sich stellenweise schwach positiv in ihren äußeren Schichten an.

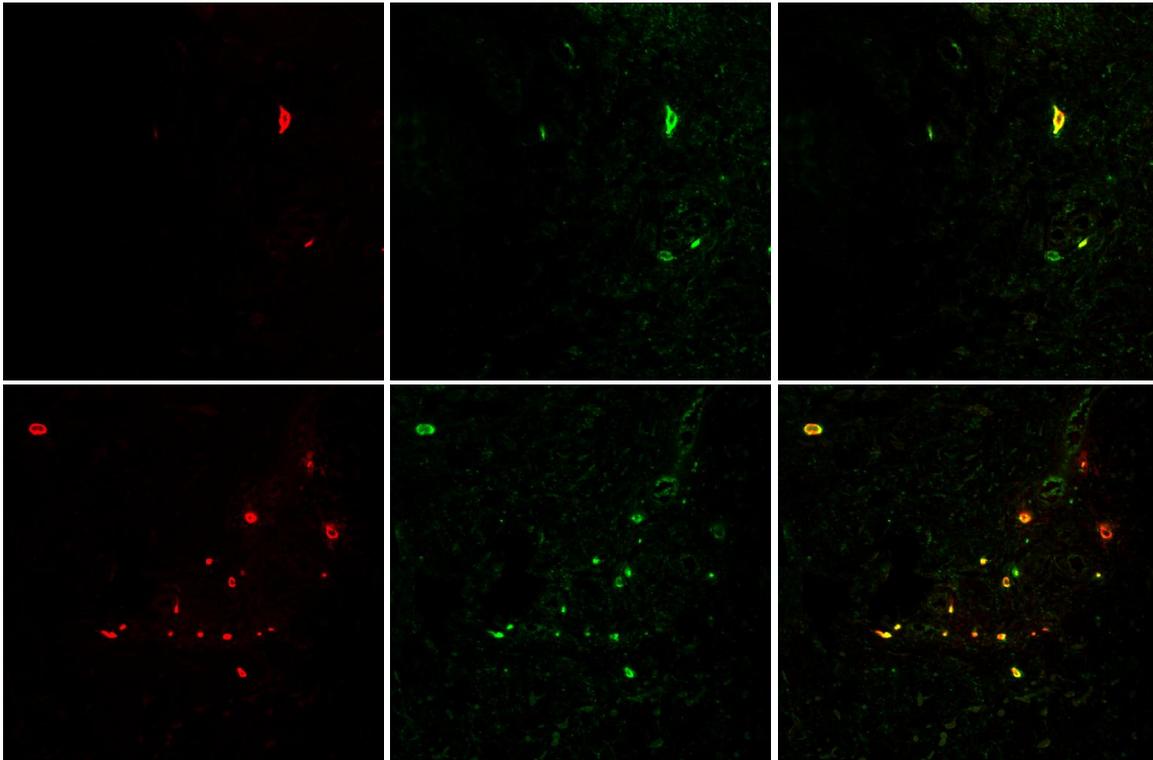
Besonders hervorzuheben ist in dieser Untersuchung (Abb. 1) der signifikante Unterschied der ILA-Rezeptor-Expression in der Haut von Gesunden versus die Haut von Psoriasis-erkrankten. In der Haut von Gesunden konnte keine ILA-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden. Hingegen fand sich eine Expression des ILA-Rezeptors nicht nur in der befallenen, sondern auch in der unbeefallenen Haut des Psoriasis-Erkrankten. In der unbeefallenen Haut der Psoriasis-erkrankten fanden sich vereinzelt ILA-Rezeptor-positive Zellen. In der Psoriasisplaque fand sich eine deutliche Zellinfiltration, die zum großen Teil aus ILA-Rezeptor-positiven Zellen bestand.

Nachdem wir diese Ergebnisse mittels der konventionellen immunhistochemischen Färbungen erhalten hatten, interessierte uns nun, welche Zellen den ILA-Rezeptor exprimieren. Diese Frage wollten wir mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen klären.

### III. 2. Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

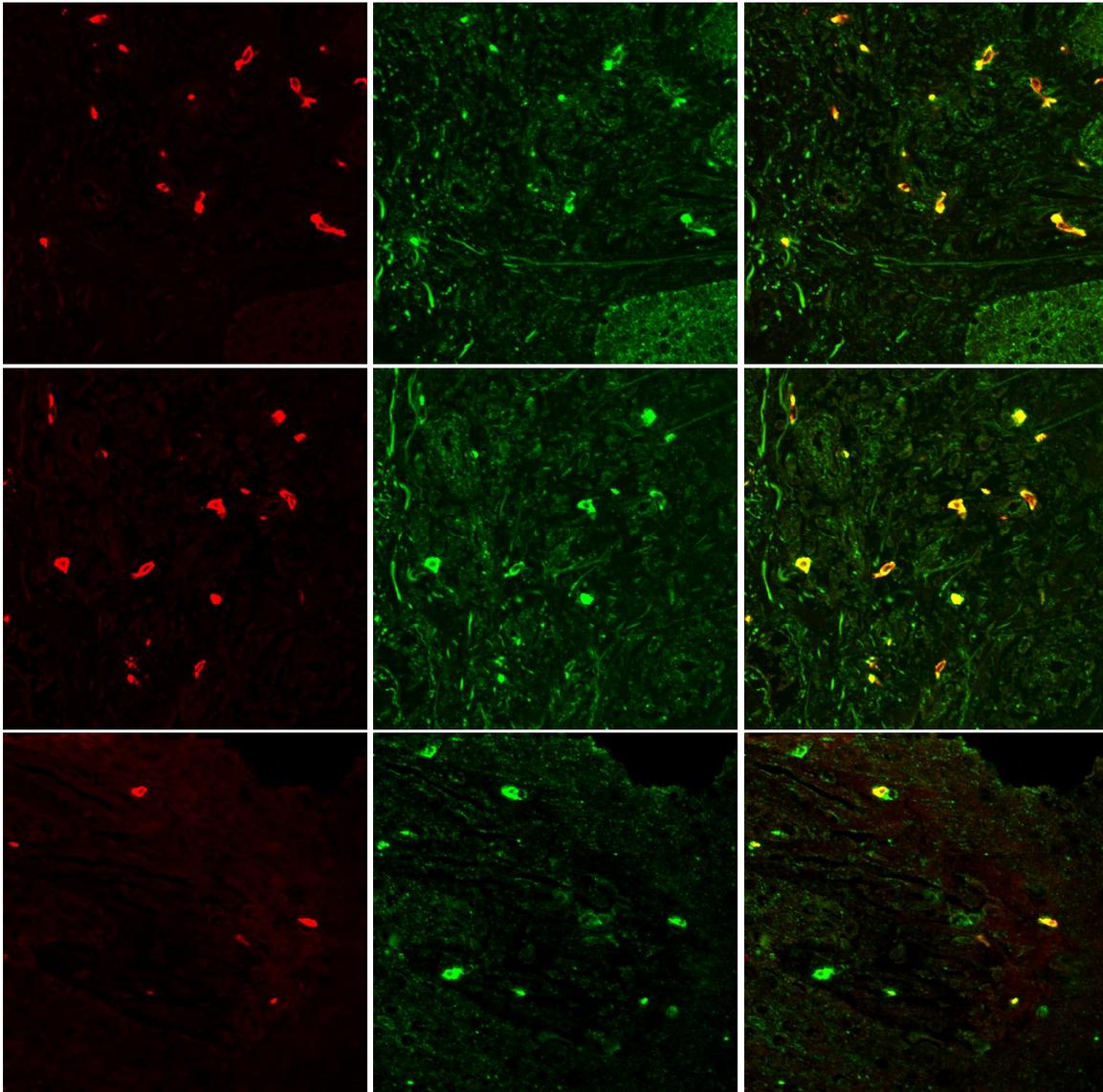
Durch immunhistologische Färbungen mittels Doppelfluoreszenz sollte nun die Frage geklärt werden, ob und in welcher Verteilung Mastzellen und T-Zellen den ILA-Rezeptor exprimieren und ob zwischen der befallenen und unbefallenen Haut des Psoriatikers Unterschiede bezüglich des exprimierenden Zelltyps festzustellen sind. Als Marker für die Mastzellen wurde Tryptase verwendet, als Marker für T-Zellen CD2. Tryptase ist eine Proteinase und wird in großer Menge durch Mastzellen exprimiert und in ihren Granula gespeichert und ist für Mastzellen spezifisch. CD2 ist ein Oberflächenmolekül und Adhäsionsmolekül, welches von T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird.

Mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen der unbefallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G) konnten wir zeigen, wie in Abbildung 2 dargestellt, dass ILA-Rezeptor auf Mastzellen exprimiert wird. Die folgenden Bilder zeigen in der ersten senkrechten Spalte die Expression von Tryptase in Mastzellen (rote Färbung), in der zweiten senkrechten Spalte die Expression von ILA-Rezeptor (grüne Färbung). Die Koexpression wird durch die Überlagerung der Bilder erleichtert dargestellt (dritte senkrechte Spalte). Zellen, die beide Moleküle exprimieren, sind gelb gefärbt.



**Abb. 2: Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in unbefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 2 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung beider Bilder gezeigt. Tryptase-positive Zellen, die den ILA-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar.

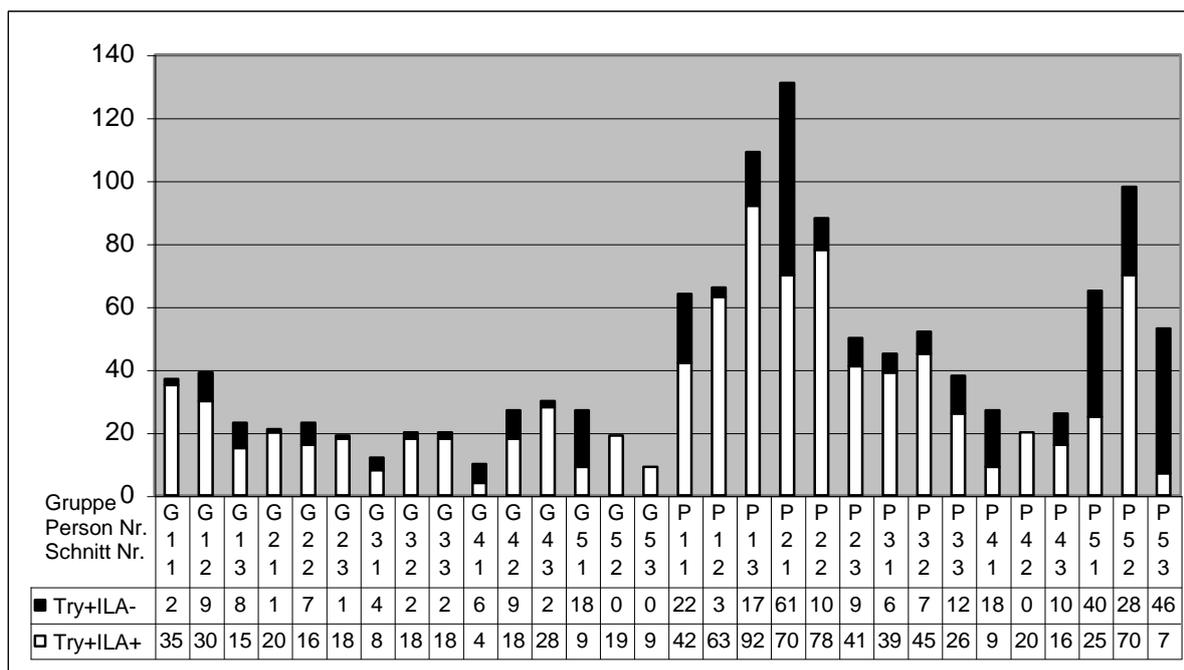
In einem nächsten Schritt untersuchten wir auch die Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der Psoriasis-Plaques (Gruppe P). Analog zu der zuvor aufgeführten Untersuchung zeigte sich auch hier eine Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen, wie in Abbildung 3 gezeigt wird.



**Abb. 3: Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der Psoriasisplaque (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 3 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung beider Bilder gezeigt. Tryptase-positive Zellen, die den ILA-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar.

Anhand dieser Immunfluoreszenzfärbungen, die an einem konfokalen Lasermikroskop ausgewertet wurden, führten wir nun die quantitative Auswertung der Schnitte durch. Hierzu wurden, wie im Methodenteil beschrieben, die Tryptase-positiven Mastzellen auf den Schnitten der 4mm-Hautstanzen gezählt. Bei dieser Zählung wurde die Anzahl der ILA-Rezeptor-positiven und ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen erfasst. Diese Werte wurden ins Verhältnis gesetzt, d.h. es wurde die prozentuale ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen ermittelt.

In der Abbildung 4 und Tabelle 9 sind die Ergebnisse der ILA-Rezeptor/Tryptase-Doppelfärbung zusammengefasst, also die Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen, die als Dreifachmessungen pro Hautbiopsie erhoben wurden. Es wurden jeweils 3 Schnitte gefärbt und ausgezählt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der ILA-Rezeptor-positiven bzw. ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen pro Schnitt abzulesen, auf der Abszisse sind die einzelnen Zählungen der Gewebeschnitte dargestellt. Insgesamt wurden die Biopsien von 5 Psoriasis-erkrankten ausgewertet, die jeweils mit der unbeeinflussten Haut der Gruppe G und mit der beeinflussten Haut der Gruppe P zugeordnet wurden. Hier ist zu entnehmen, dass die Zahl der Mastzellen in der Psoriasis-Plaques im Mittel deutlich höher ist, als in unbeeinflusster Haut des Psoriasis-erkrankten. Ein wesentlicher Teil dieser Mastzellen ist ILA-Rezeptor-positiv. Der ILA-positiv Mastzellanteil in der unbeeinflussten Haut des Psoriasis-erkrankten unterscheidet sich nicht signifikant von dem in Psoriasis-Plaques, wie die statistische Auswertung zeigt (Abb. 6).

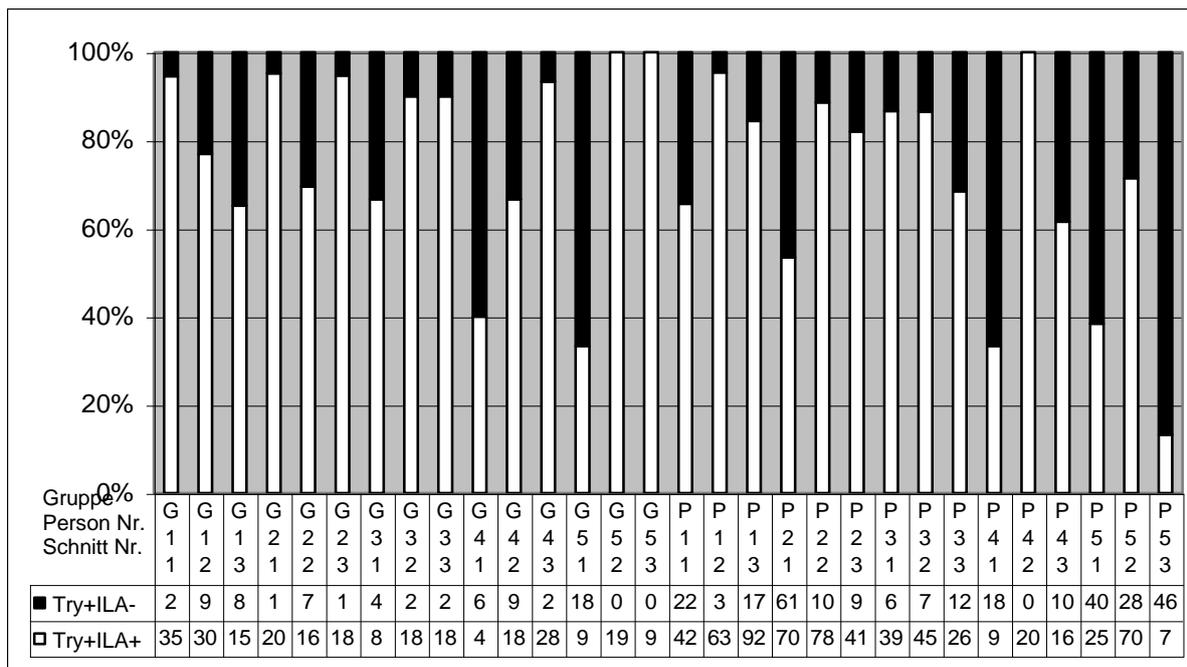


**Abb. 4: Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in unbeeinflusster Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasis-Plaques.** Die Ordinate zeigt die Zahl der absolut gezählten ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen (Try+ILA+) und der ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen (Try+ILA-) pro Schnitt. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze. Die Abszisse bestimmt den ausgewerteten Gewebeschnitt von unbeeinflusster Haut (G) und beeinflusster Haut (P) von 5 Psoriasis-erkrankten, die durch die Ziffer unter dem G bzw. P benannt werden. Es wurden von jeder Hautbiopsie jeweils 3 Schnitte ausgezählt, was in der zweiten horizontalen Zahlenreihe erkennbar wird. Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

Bereits in der konventionellen Immunhistochemie konnten wir den signifikanten Unterschied in der ILA-Rezeptor-Expression zwischen der Haut gesunder Probanden und der Haut von Psoriasis-erkrankten nachweisen. Hier hatte sich gezeigt, dass in der Haut gesunder Probanden keine ILA-Rezeptor-Expression nachweisbar war, wohl aber nicht nur in der betroffenen, sondern auch in der unbefallenen Haut von Psoriasis-erkrankten. Die Ergebnisse der Auszählung in der Doppelimmunfluoreszenz zeigten auch ganz klar, dass sich die Gesamtzahl der Mastzellen in unbefallener und befallener Psoriasis-Haut stark zugunsten der betroffenen Haut unterschied, also mit zunehmendem Aktivierungsstadium in der Psoriasis die Mastzellanzahl in den Gewebeschnitten zunahm. So wurden in den Gewebeschnitten der unbefallenen Haut von Psoriasis-erkrankten im Mittel 22,4 Mastzellen gezählt, in den Gewebeschnitten der Psoriasisplaques im Mittel 62,13 Mastzellen. Statistisch lassen sich diese Zahlen jedoch nicht verwerten, da die absoluten Zahlen bei ungleicher Schnittfläche der Präparate nur semiquantitativ verwertbar sind. Diese Zahlen bestätigen jedoch den qualitativen Eindruck, den der Betrachter gewinnt. Sowohl in unbefallener wie in befallener Haut war ein wesentlicher Anteil dieser Mastzellen ILA-Rezeptor-positiv.

Zur Klärung der Frage, wie sich die ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen in den unterschiedlichen Stadien der Psoriasis verändert, untersuchten wir die relative prozentuale Expression von ILA-Rezeptor auf den Mastzellen. Diese Daten sind statistisch verwertbar, da sie von der Schnittfläche unabhängig sind.

Entsprechend sind die Daten in Abbildung 5 dargestellt. Die Abszisse zeigt die bekannten Messreihen, der Ordinate ist die prozentuale ILA-Rezeptor-Expression auf den Mastzellen zu entnehmen.



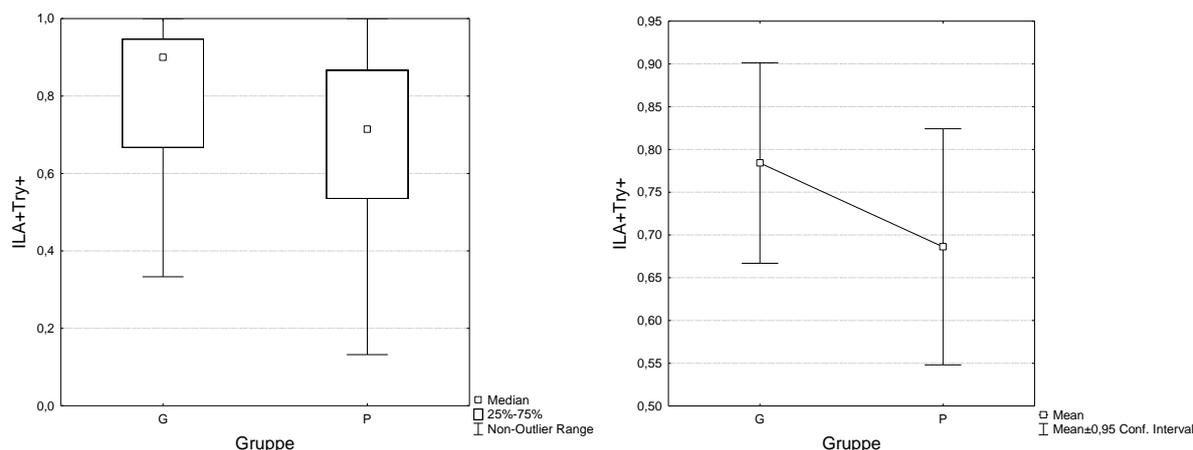
**Abb. 5: Relative Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasisplaque.** Die Ordinate zeigt die relativen Anteile der ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen (Try+ILA+) und der ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen (Try+ILA-) pro Schnitt. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze. Die Abszisse bestimmt den ausgewerteten Gewebeschnitt von unbeefallener Haut (G) und befallener Haut (P) von 5 Psoriasis-erkrankten, die durch die Ziffer unter dem G bzw. P benannt werden. Es wurden von jeder Hautbiopsie jeweils 3 Schnitte ausgezählt, was in der zweiten horizontalen Zahlenreihe erkennbar wird. Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

In unserer statistischen Auswertung sind diese relativen (prozentualen) Werte der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen untersucht worden. Die Unterschiede in der relativen ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen in der Haut gesunder Probanden (Gruppe C) und in der unbeefallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G) und in der Psoriasisplaque (Gruppe P) wurden genauer untersucht. In der folgenden Tabelle 8 werden die Mean-Werte als relativer prozentualer Wert sowie Varianz und Konfidenzintervall dargestellt.

Gruppe	n	Zelltyp	Molekül	Mean	Varianz	Konfidenzintervall (+/-95%)	
C	5	Try	ILA	0,00	0,00	0,00	0,00
G	15	Try	ILA	0,78	0,04	0,67	0,90
P	15	Try	ILA	0,69	0,06	0,55	0,82

**Tab. 8: Die Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasis-Plaques unterscheidet sich nicht signifikant.** In Hautbiopsien gesunder Probanden findet sich keine Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen. Dargestellt sind die relativen Zahlen der Expression von ILA-Rezeptor (ILA) auf Mastzellen (Try), die an den Schnitten von unbeefallener Haut (Gruppe G) und beefallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten sowie 5 gesunden Kontrollpersonen (Gruppe C) ermittelt wurden. Die Biopsien der Gruppe C wurden einmal ausgewertet, die Biopsien der Gruppe G und P jeweils dreifach angefertigt und ausgewertet. Die Färbungen in den Gruppen G und P wurden für jedes Individuum an 3 verschiedenen Schnitten durchgeführt und ausgewertet. Daher unterscheidet sich die Anzahl der pro Gruppe ausgewerteten Gewebeschnitte (Gruppe C n=5, Gruppe G n=15, Gruppe P n=15).

Um die Signifikanz der Daten zu überprüfen, modellierten wir die Daten mit einem linearen gemischten Modell (vgl. Abb. 6). Wir nahmen dabei gleiche Varianzen, also eine sogenannte Compound-Symmetry-Kovarianzstruktur an. Es zeigte sich signifikant, dass zwischen gesunden Kontrollpersonen (Mean 0,0, Varianz 0,0, Konfidenzintervall 0,0) und Psoriasis-erkrankten sowohl in beefallener (Mean 0,69, Varianz 0,06, Konfidenzintervall 0,55 – 0,82, p-Wert < 0,0001) als auch in unbeefallener (Mean 0,78, Varianz 0,04, Konfidenzintervall 0,67 – 0,90, p-Wert < 0,0001) Haut Unterschiede in der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen vorliegen. Während sich beim Gesunden keine ILA-Rezeptor-Expression in der Haut fand, lag diese beim Psoriasis-erkrankten vor. Signifikante Unterschiede zwischen der unbeefallenen und beefallenen Haut der Psoriasis-erkrankten in der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen zeigten sich nicht (p-Wert 0,1841), jedoch war als Trend erkennbar, dass die prozentuale Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der beefallenen Haut (Mean 0,69, Varianz 0,06, Konfidenzintervall 0,55 – 0,82) geringer war als in der unbeefallenen Haut (Mean 0,78, Varianz 0,04, Konfidenzintervall 0,67 – 0,90).



**Abb. 6: Keine statistische Signifikanz in der Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen zwischen unbeefallener und befallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Als Trend ist erkennbar, dass die prozentuale Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der Psoriasis-Plaques geringer ist als in der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten. Grafische Darstellung der relativen ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen (ILA+Try+) auf der Ordinate mit Angabe des Median- bzw. des Mean-Wertes und des Konfidenzintervalls für unbeefallene Haut (Gruppe G) und befallene Haut (Gruppe P) von Psoriasis-erkrankten. Auf der Abszisse sind die beiden untersuchten Gruppen aufgetragen.

### III. 3. Verlässlichkeit der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen und der Auswertung durch den Untersucher

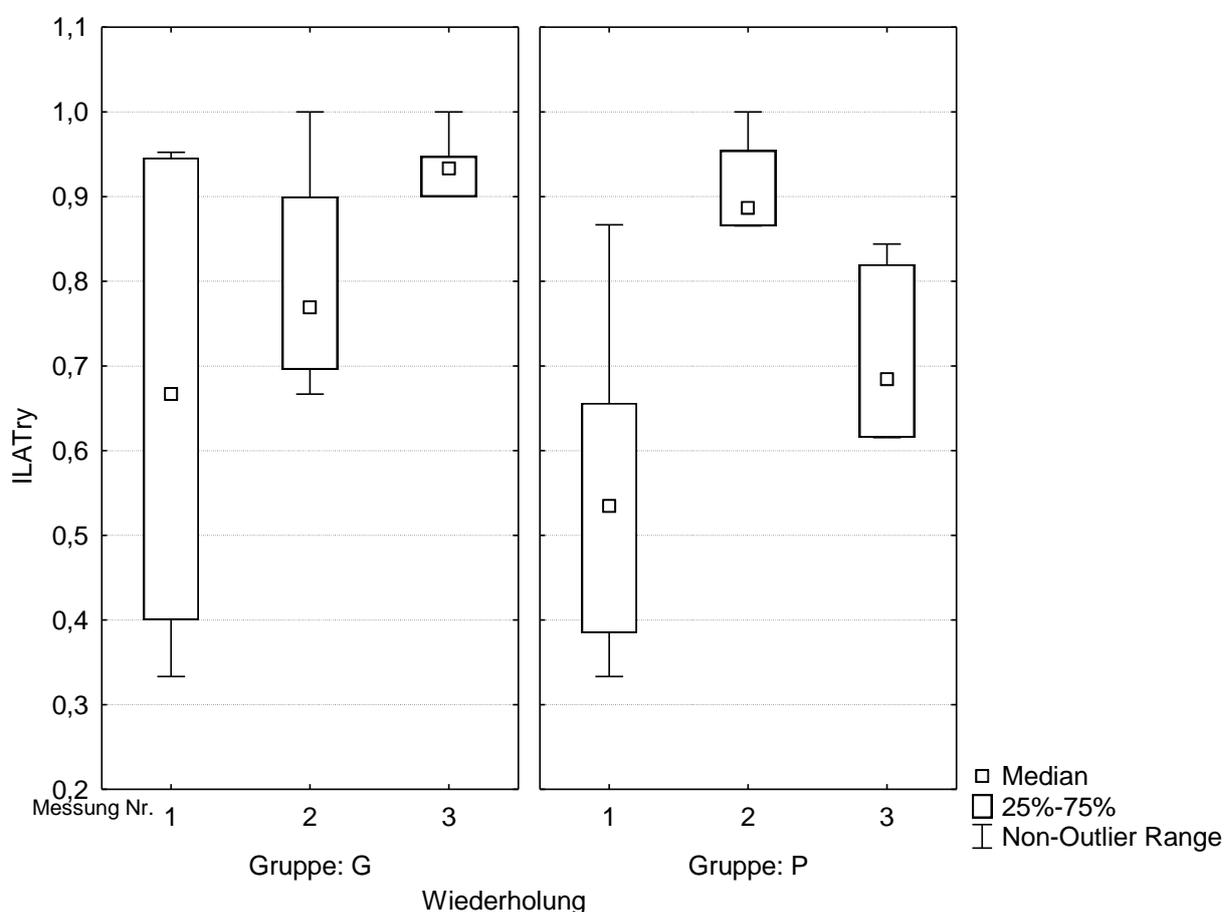
Anhand der Messungen der Expression des ILA-Rezeptors an jeweils 3 separat gefärbten und gezählten Schnitten der 5 Biopsien der Gruppen G und P sollte nun die Verlässlichkeit der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen und der Auswertung durch den Untersucher validiert werden.

Die Daten dieser Dreifachmessungen sind in der folgenden Tabelle 9 sowie grafisch in den vorherigen Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Aus den absoluten Zahlen der Mastzellen und ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen bzw. ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen wurden die prozentualen Verhältnisse von ILA-Rezeptor-positiven und ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen errechnet.

Gruppe	Person	Messung	Try+	Try+ILA+	Try+ILA-	%Try+ILA+	%Try+ILA-
G	1	1	37	35	2	94,59	5,41
G	1	2	39	30	9	76,92	23,08
G	1	3	23	15	8	65,22	34,78
G	2	1	21	20	1	95,24	4,76
G	2	2	23	16	7	69,57	30,43
G	2	3	19	18	1	94,74	5,26
G	3	1	12	8	4	66,67	33,33
G	3	2	20	18	2	90,00	10,00
G	3	3	20	18	2	90,00	10,00
G	4	1	10	4	6	40,00	60,00
G	4	2	27	18	9	66,67	33,33
G	4	3	30	28	2	93,33	6,67
G	5	1	27	9	18	33,33	66,67
G	5	2	19	19	0	100,00	0,00
G	5	3	9	9	0	100,00	0,00
P	1	1	64	42	22	65,63	34,38
P	1	2	66	63	3	95,45	4,55
P	1	3	109	92	17	84,40	15,60
P	2	1	131	70	61	53,44	46,56
P	2	2	88	78	10	88,64	11,36
P	2	3	50	41	9	82,00	18,00
P	3	1	45	39	6	86,67	13,33
P	3	2	52	45	7	86,54	13,46
P	3	3	38	26	12	68,42	31,58
P	4	1	27	9	18	33,33	66,67
P	4	2	20	20	0	100,00	0,00
P	4	3	26	16	10	61,54	38,46
P	5	1	65	25	40	38,46	61,54
P	5	2	98	70	28	71,43	28,57
P	5	3	53	7	46	13,21	86,79

**Tab. 9: Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen.** Tryptase wurde als Marker für Mastzellen verwendet. Es wurden Mastzellen auf jeweils 3 unterschiedlichen Schnitten von unbeefallener (Gruppe G) und befallener (Gruppe P) Haut von jeweils 5 Psoriasis-erkrankten gezählt, so dass Dreifachmessungen entstanden. Die individuelle Nummer der jeweiligen erkrankten Person ist in der zweiten senkrechten Spalte angegeben, Messungen 1-3 sind in der dritten senkrechten Spalte angegeben. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten Mastzellen (Try+), ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen (Try+ILA+) und ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen (Try+ILA-) sowie die relativen Zahlen für die ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen (%Try+ILA+) und ILA-Rezeptor-negativen Mastzellen (%Try+ILA-).

Zur Überprüfung der Reliabilität unserer Färbungen in der Doppelimmunfluoreszenztechnik sowie der Zählung durch den Untersucher haben wir die oben beschriebenen Dreifachmessungen angefertigt. Es wurde an jeweils 3 unterschiedlichen Schnitten der befallenen und unbefallenen Haut aller 5 Psoriasis-erkrankten ILA-Rezeptor-/Tryptase-Doppelfärbungen durchgeführt und ausgewertet. Zur Frage der Reliabilität und signifikanter Unterschiede modellierten wir die Daten in einer Boxplot-Darstellung mit Ausweisung des Medians sowie der 25%- und 75%-Quantile mit Whiskers, die die maximalen und minimalen Werte aufzeigen. Dies ist der Abbildung 7 zu entnehmen.



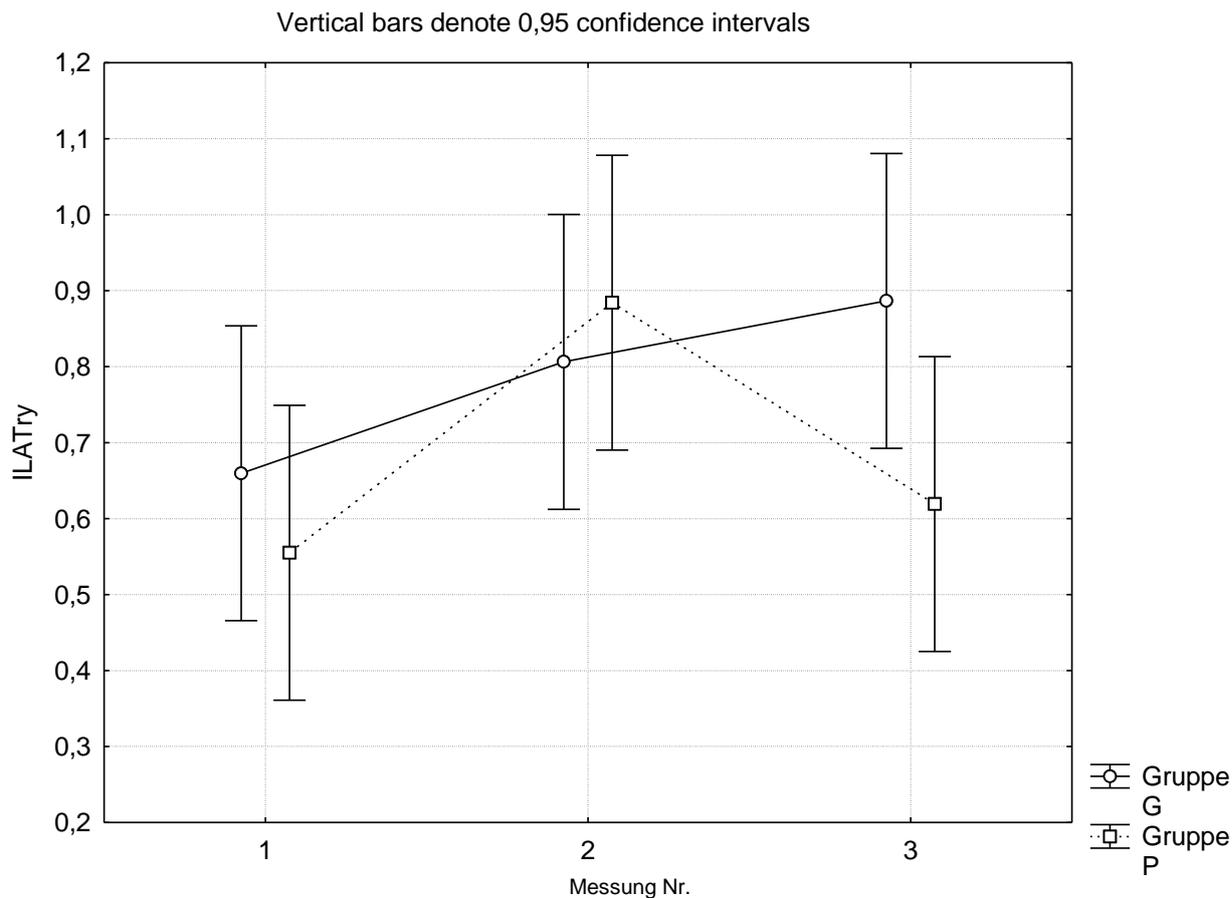
**Abb. 7: Signifikante Unterschiede innerhalb der Dreifachmessungen einer Gruppe und keine signifikanten Unterschiede in der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen zwischen unbefallener und befallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Grafische Darstellung der relativen ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen (ILATry) mit Angabe des Median-Wertes und der 25%- und 75%-Quantile sowie der minimalen und maximalen gemessenen Werte für unbefallene Haut (Gruppe G) und befallene Haut (Gruppe P) von Psoriasis-erkrankten bei Dreifachmessungen. Auf der Ordinate ist die relative ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen (ILATry) angegeben, auf der Abszisse sind die einzelnen Messungen (Messung Nr. 1 - 3) innerhalb der Dreifachmessung an jeweils 5 Psoriasis-erkrankten angegeben. Die Einzelmessungen innerhalb einer Gruppen weichen signifikant voneinander ab (p-Wert 0,0417). Insgesamt bestehen keine signifikanten Unterschiede in der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen zwischen den Gruppen G und P (p-Wert 0,1841).

Wir modellierten weiter ein lineares gemischtes Modell unter der Annahme, dass die Wiederholung ein fester Faktor und nicht zufällig ist. In einem statistischen Signifikanztest erhielten wir für die Dreifachmessung folgenden p-Werte, die in der folgenden Tabelle 10 dargestellt sind.

Effekt	p-Wert	Interpretation
Gruppe: Unterscheiden sich die beiden Gruppen G vs. P?	0,1841	Nicht signifikant: Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen
Wiederholung: Unterscheiden sich die Dreifachmessungen?	0,0417	Signifikant: Signifikanter Unterschied zwischen den Dreifachmessungen
Wechselwirkung Gruppe und Wiederholung: Sind die Verläufe der Wiederholungen in den beiden Gruppen parallel?	0,1675	Nicht signifikant: Keine signifikante Wechselwirkung

**Tab. 10: Signifikante Unterschiede innerhalb der Dreifachmessungen einer Gruppe ohne Parallelität der Verläufe innerhalb einer Gruppe und keine signifikanten Unterschiede in der ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen zwischen unbefallener und befallener Haut von Psoriasispatienten.** Mit einem t-Test unter der Annahme, dass die Wiederholung ein fester Faktor und nicht zufällig ist, wird untersucht, ob sich zwischen den Gruppen G (unbefallene Haut des Psoriatikers) und P (Psoriasisplaque) bzw. innerhalb der Dreifachmessungen signifikante Unterschiede ergeben. Weiterhin wurde untersucht, ob die Verläufe der Wiederholungen in den beiden Gruppen parallel verlaufen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Dreifachmessungen und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, es bestand keine signifikante Wechselwirkung. Der Begriff der Wechselwirkung wird in Abb. 8 näher dargestellt.

Wiederum zeigte sich auch in diesem Signifikanztest (siehe Tab. 10), dass sich zwischen den Gruppen G (unbefallene Haut des Psoriatikers) und P (Psoriasisplaque) keine signifikanten Unterschiede ergaben (p-Wert 0,1841), sich aber die Dreifachmessungen signifikant voneinander unterschieden (p-Wert 0,0417). Zur Frage der Wechselwirkung zwischen Gruppe und Wiederholung stellten wir die Frage, ob die Verläufe der Wiederholungen in beiden Gruppen parallel waren. Es zeigte sich keine signifikante Wechselwirkung (p-Wert 0,1675). In einem Mean-Error-Plot (Abb. 8), in welchem jeweils der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall dargestellt sind, wird die Interaktion zwischen den Gruppen in den einzelnen Messungen beschrieben.



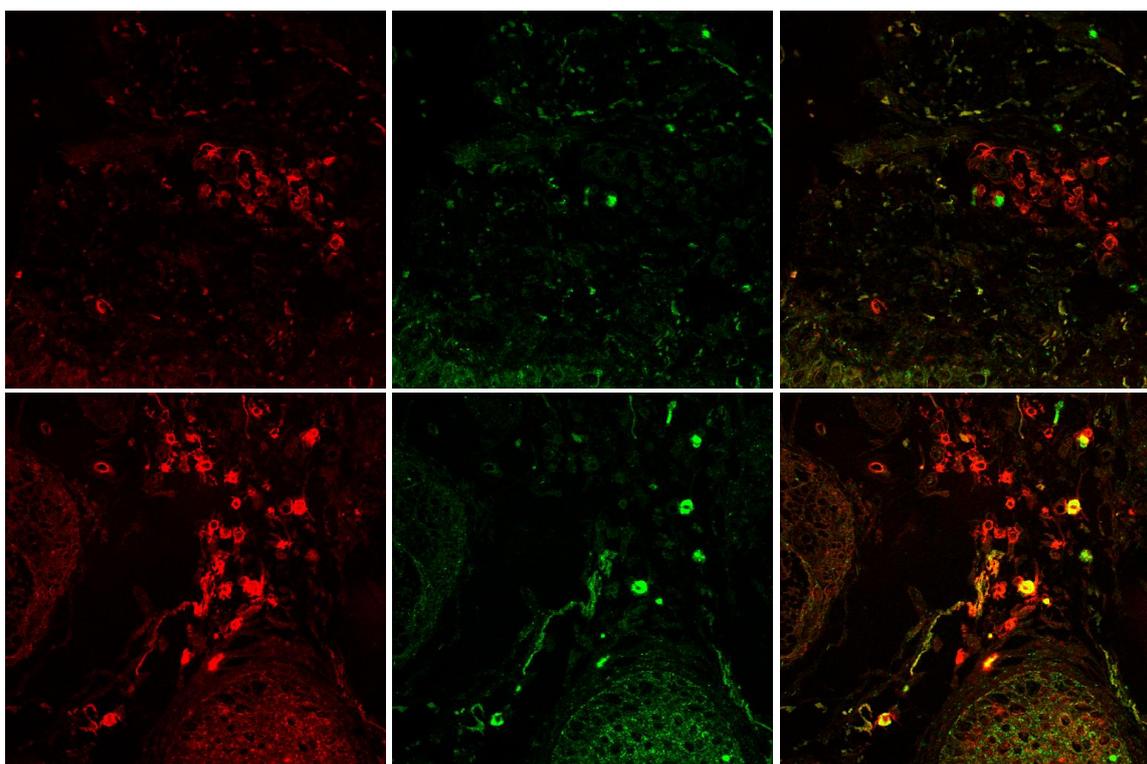
**Abb. 8: Keine Parallelität der Verläufe der Wiederholungen innerhalb der Gruppen bei Dreifachmessung.** Der Mean-Error-Plot stellt die Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle der Gruppe G (unbefallene Haut des Psoriatikers) und Gruppe P (Psoriasisplaque) in den drei unterschiedlichen Messungen für ILA-Rezeptor-positive Mastzellen dar. Dabei zeigt die Ordinate den relativen Anteil der ILA-Rezeptor-positiven Mastzellen (ILATry) und die Abszisse die jeweilige Nummer der Messung innerhalb der Dreifachmessung, hier als Wiederholung bezeichnet. Es handelt sich um die Auswertung von 3 verschiedenen Schnitten von jeweils 5 Psoriasis-erkrankten, denen jeweils eine Hautbiopsie aus unbeeinträchtigter und befallener Haut entnommen worden war.

### III. 4. Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

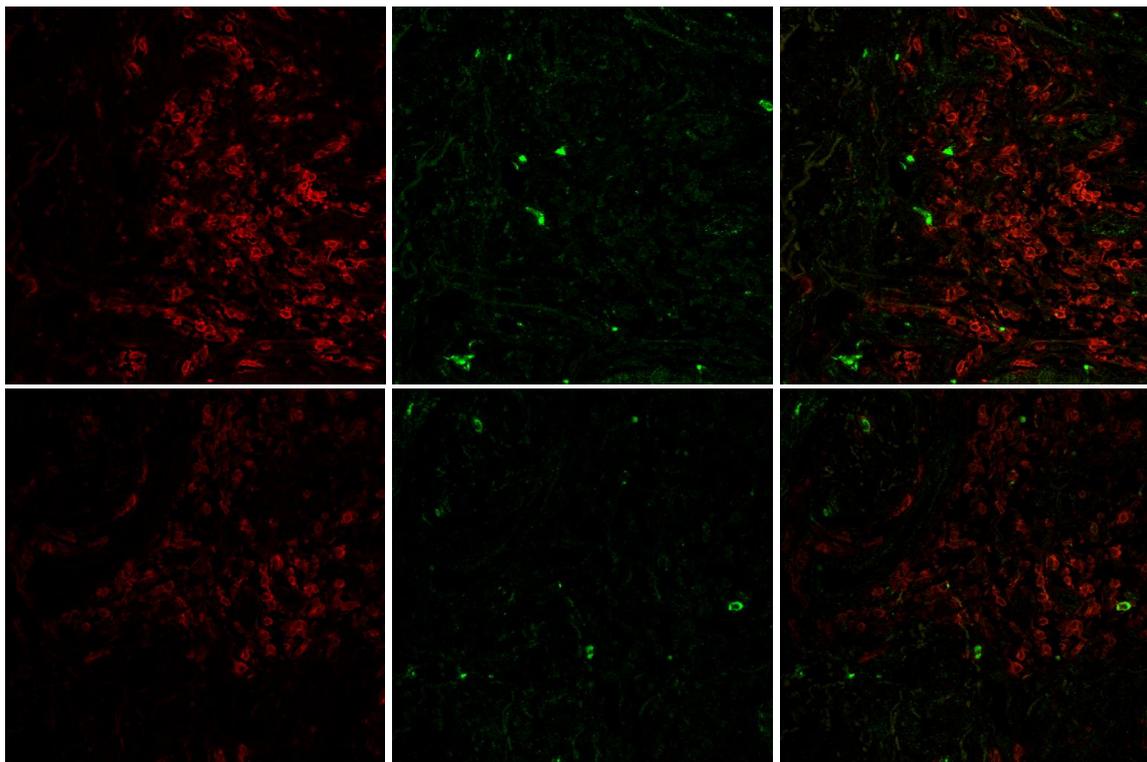
In der Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzen für ILA-Rezeptor auf Mastzellen war aufgefallen, dass es eine große Anzahl ILA-Rezeptor-positiver, aber Tryptase-negativer Zellen gab, die wir näher charakterisieren wollten. Unser Interesse galt der Zell-Zell-Interaktion von Mastzellen und T-Zellen in der Psoriasis und wir vermuteten eine Expression von ILA-Rezeptor durch T-Zellen oder dendritische Zellen. Es war bekannt, dass grundsätzlich auch T-Zellen den ILA-Rezeptor exprimieren können. Wir etablierten daher eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für den ILA-Rezeptor und CD2 als Pan-T-Zell-Marker. Da CD2 auch von NK-Zellen exprimiert wird, ist neben den hauptsächlich die Psoriasis-haut infiltrierenden T-Zellen sicher auch ein

kleiner Anteil von NK-Zellen erfasst worden. Hierauf wird in der Diskussion in Kapitel IV. 3. eingegangen.

In den Färbungen an unbeefallener (Gruppe G) und befallener (Gruppe P) Haut von Psoriasis-erkrankten untersuchten wir die Expression von ILA-Rezeptor auf CD2-positiven Zellen. In den folgenden Abbildungen (Abb. 9 und 10) ist in der ersten senkrechten Spalte (rote Färbung) die Expression von CD2 am Gewebeschnitt zu sehen, in der zweiten senkrechten Spalte (grüne Färbung) die Expression von ILA-Rezeptor. Die Koexpression erscheint bei Überlagerung der Bilder (dritte senkrechte Spalte) gelb. Als Ergebnis unserer Untersuchungen sahen wir sowohl in unbeefallener Haut als auch in der Psoriasisplaque eine nur geringe Expression von ILA-Rezeptor auf CD2-positiven Zellen.



**Abb. 9: Geringe Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 2 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung beider Bilder gezeigt. Wenige CD2-positive Zellen exprimieren den ILA-Rezeptor. Sie stellen sich gelb gefärbt dar.



**Abb. 10: Keine signifikante Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt eine weitgehend negative Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in der Psoriasisplaque (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch zwei Gewebeschnitte von Psoriasis-erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung beider Bilder gezeigt.

Die folgende Tabelle 11 zeigt die Werte, die mittels ILA-Rezeptor/ CD2-Doppelimmunfluoreszenz für T-Zellen erhoben wurden. Bei gesunden Probanden (Gruppe C) hatte sich konventionell immunhistochemisch keine ILA-Rezeptor-Expression gefunden, so dass keine Doppelimmunfluoreszenzen angefertigt wurden. In der Gruppen G (unbefallene Haut des Psoriatikers) und Gruppe P (Psoriasisplaque) konnten wir eine Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen nachweisen. In der Psoriasisplaque fand sich eine signifikant höhere T-Zell-Infiltration (CD2+) als in unbefallener Haut des Psoriasis-erkrankten. Aber nur ein geringer Teil dieser T-Zellen war ILA-Rezeptor-positiv (CD2+ILA+), der größere Teil war ILA-Rezeptor-negativ (CD2+ILA-). In der sechsten und siebten senkrechten Spalte der Tabelle sind die entsprechenden prozentualen Verteilungen für ILA-Rezeptor-positive (CD2+ILA+) und ILA-Rezeptor-negative (CD2+ILA-) T-Zellen aufgeführt.

Gruppe	Person	CD2+	CD2+ILA+	CD2+ILA-	%CD2+ILA+	%CD2+ILA-
G	1	4	1	3	25,00	75,00
G	2	52	7	45	13,46	86,54
G	3	92	10	82	10,87	89,13
G	4	34	1	33	2,94	97,06
G	5	45	1	44	2,22	97,78
P	1	223	42	181	18,83	81,17
P	2	687	3	684	0,44	99,56
P	3	370	12	358	3,24	96,76
P	4	240	7	233	2,92	97,08
P	5	321	28	293	8,72	91,28

**Tab. 11: Expression des ILA-Rezeptors auf T-Zellen der unbefallenen und befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten CD2-positiven Zellen (CD2+), ILA-Rezeptor-positiven CD2-Zellen (CD2+ILA+) und der ILA-Rezeptor-negativen CD2-Zellen (CD2+ILA-) sowie die relativen Zahlen für die ILA-Rezeptor-positiven CD2-Zellen (%CD2+ILA+) und ILA-Rezeptor-negativen CD2-Zellen (%CD2+ILA-), die an den Schnitten von unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von fünf Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze.

Konventionell immunhistochemisch hatten wir bereits festgestellt, dass gesunde Probanden (Gruppe C) keine ILA-Rezeptor-Expression in der Haut zeigen.

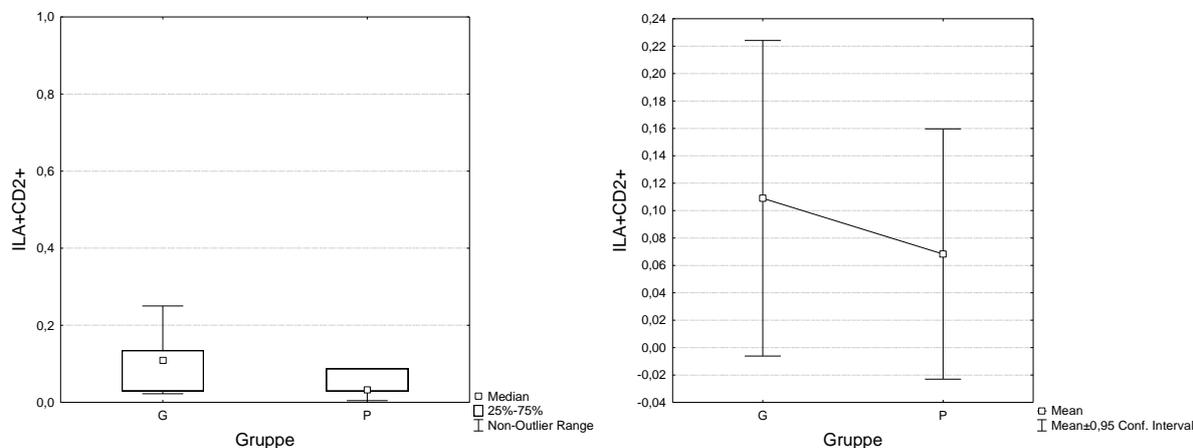
Nun untersuchten wir statistisch die Frage, ob sich in der ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen, abhängig vom Aktivierungsstadium der Psoriasis, Unterschiede finden (Tab. 12). Hierzu bestimmten wir die relative prozentuale ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen in den Gruppen G (unbefallene Haut des Psoriasis-erkrankten) und Gruppe P (Psoriasisplaque).

Gruppe	n	Zelltyp	Molekül	Mean	Varianz	Konfidenzintervall (+/-95%)	
C	5	CD2	ILA	0,00	0,00	0,00	0,00
G	5	CD2	ILA	0,11	0,01	-0,01	0,22
P	5	CD2	ILA	0,07	0,01	-0,02	0,16

**Tab. 12: Expression des ILA-Rezeptors auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden sowie in unbefallener und befallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die relativen Zahlen der Expression von ILA-Rezeptor, die an den Schnitten von unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten sowie von 5 gesunden Kontrollpersonen (Gruppe C) ermittelt wurden.

Für die Expression des ILA-Rezeptors auf T-Zellen fand sich ein ähnliches Bild, analog zu der Expression auf Mastzellen. In der Normalhaut (Gruppe C) fand sich keine Expression des ILA-Rezeptors (Mean 0,0, Varianz 0,0, Konfidenzintervall 0,0). Die ILA-Expression auf T-Zellen in befallener (Mean 0,07, Varianz 0,01,

Konfidenzintervall  $-0,02 - 0,16$ ) und unbefallener Haut (Mean  $0,11$ , Varianz  $0,01$ , Konfidenzintervall  $-0,01 - 0,22$ ) zeigte keine signifikanten Unterschiede, wie der voranstehenden Tabelle 12 und der folgenden Abbildung 11 zu entnehmen ist.



**Abb. 11: Keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen in der unbefallenen und befallenen Haut von Psoriasispatienten.** Als Marker für T-Zellen diente CD2. Auf der Ordinate dargestellt ist die relative Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen (ILA+CD2+) (mit Angabe des Median- bzw. des Mean-Wertes und des Konfidenzintervalls) in der unbefallenen Haut (Gruppe G) und befallenen Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasispatienten. Auf der Abszisse sind die beiden untersuchten Gruppen aufgetragen.

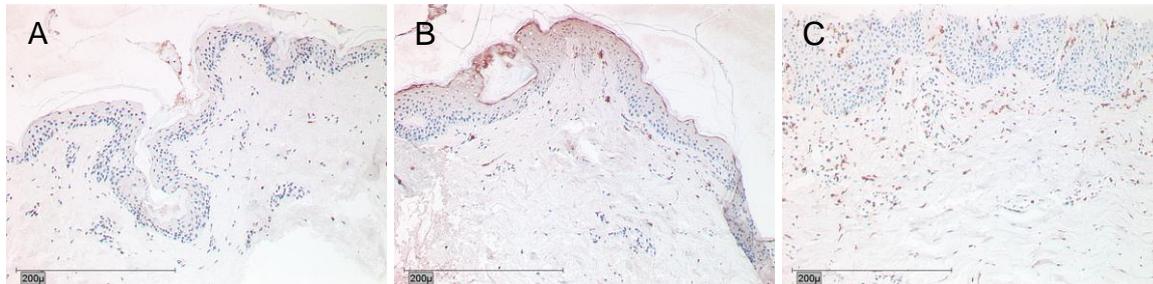
Aufgrund der insgesamt geringen ILA-Rezeptor-Expression auf den T-Zellen zeigte sich in der statistischen Auswertung (Tab. 13) kein signifikanter Unterschied zwischen der Haut gesunder Probanden (Gruppe C), der unbefallenen (Gruppe G) und befallenen (Gruppe P) Haut von Psoriasispatienten.

	p-Wert	Interpretation
<b>Gruppe P vs. G</b>	0,507	Nicht signifikant
<b>Gruppe C vs. P</b>	0,107	Nicht signifikant
<b>Gruppe C vs. G</b>	0,058	Nicht signifikant

**Tab. 13: Keine statistisch signifikanten Unterschiede im t-Test für verbundene Stichproben für die relative Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen in den einzelnen Gruppen.** Mit einem t-Test für verbundene Stichproben wurde untersucht, ob sich die ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen in befallener (Gruppe P) und unbefallener (Gruppe G) Haut von 5 Psoriasispatienten signifikant unterscheidet. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Haut von 5 gesunden Probanden (Gruppe C) und die befallene (Gruppe P) und unbefallene (Gruppe G) Psoriasis-Haut signifikant unterscheiden. Es fanden sich aufgrund der insgesamt geringen prozentualen ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen keine signifikanten Unterschiede.

### III. 5. Expression von ICOS-Rezeptor beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Neben dem ILA-Rezeptor, der nach der bisher bekannten Literatur vornehmlich mit der TH1-Reaktion assoziiert ist (Shuford et al. 1997, Kim et al. 1998), wollten wir auch ein System untersuchen, das – wie der ICOS-Rezeptor – die TH2-Reaktion begünstigend beeinflusst (Tesciuba et al. 2001, Gonzalo et al. 2001, Coyle et al. 2000). Da auch für dieses System bisher keine ausreichenden Erfahrungen in der Entzündungsreaktion in menschlichem Gewebe vorlagen, sollten unsere Untersuchungen neue Kenntnisse bringen. Auch die Expression des ICOS-Rezeptors wurde daher zuerst konventionell immunhistochemisch untersucht. Hier fand sich, analog zu der Expression des ILA-Rezeptors, dass der ICOS-Rezeptor in der Haut gesunder Probanden nicht exprimiert wird. Hingegen fand sich in der Haut von Psoriasis-erkrankten eine Expression des ICOS-Rezeptors. Sowohl die befallene als auch die unbeeinträchtigte Haut des Psoriasis-erkrankten zeigte eine Infiltration mit Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimierten, wie die folgende Abbildung 12 zeigt.

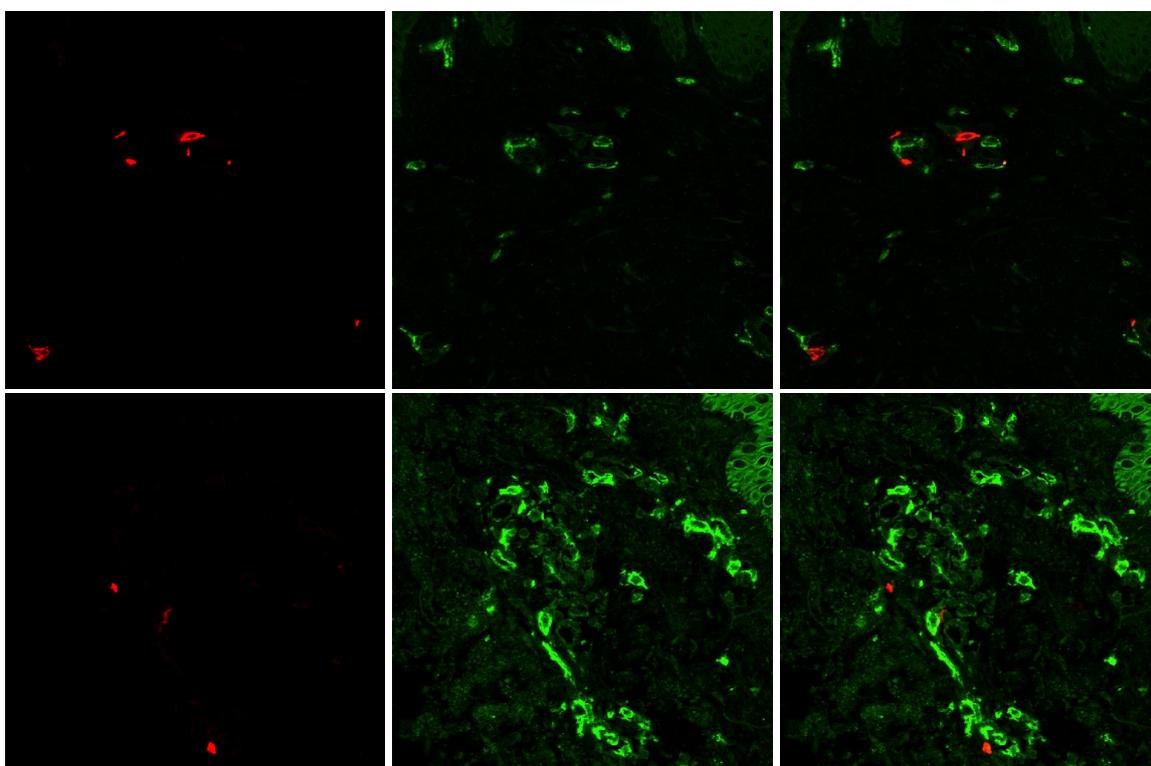


**Abb. 12: Expression von ICOS-Rezeptor im Gewebeschnitt von gesunden Probanden (A), unbeeinträchtigter Haut von Psoriasis-erkrankten (B) und in der Psoriasis-Plaques (C).** A) In dem Gewebeschnitt eines gesunden Probanden findet sich keine Expression des ICOS-Rezeptors. B) In der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasis-erkrankten ist eine Expression des ICOS-Rezeptors auf Zellen in der Dermis erkennbar. C) In der Psoriasis-Plaques sieht man eine deutlich heraufgesetzte Expression des ICOS-Rezeptors. A-C) Diese Untersuchungen wurden an jeweils 5 gesunden und 5 erkrankten Individuen durchgeführt und die Ergebnisse ließen sich in allen Proben reproduzieren. In die Dermis infiltrierende Entzündungszellen sind ICOS-Rezeptor-positiv, die Epidermis färbt sich stellenweise schwach positiv in ihren äußeren Schichten an.

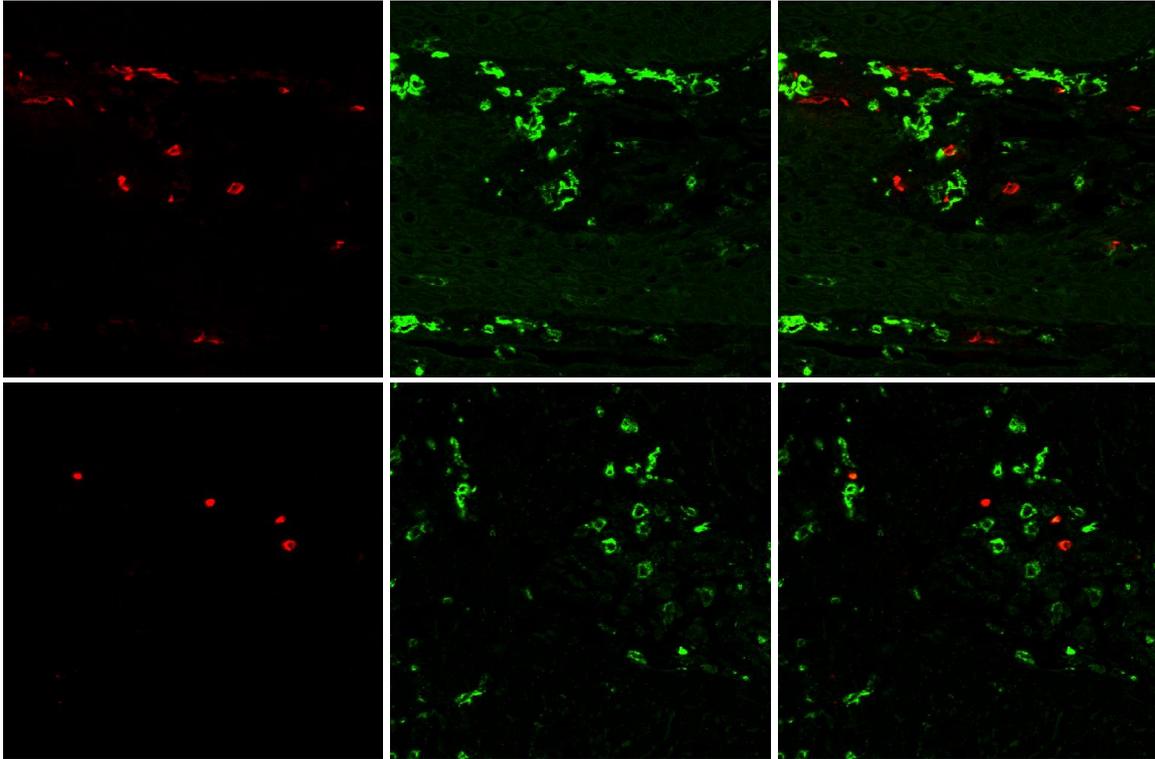
### III. 6. Expression von ICOS-Rezeptor auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Wiederum sollte durch immunhistochemische Untersuchungen in Doppelfluoreszenztechnik geklärt werden, welche Zellen in der Haut des Psoriasis-erkrankten den ICOS-Rezeptor exprimieren. Als Marker für Mastzellen

wurde erneut Tryptase verwendet. Für unsere Untersuchungen wurden zunächst Doppelimmunfluoreszenzen für ICOS-Rezeptor und Tryptase angefertigt, um die ICOS-Rezeptor-Expression auf Mastzellen zu untersuchen. Wie die folgenden Abbildungen 13 und 14 zeigen, konnte auf Mastzellen keine ICOS-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden. Dies gilt für gesunde Kontrollpersonen, in deren Haut – wie oben erwähnt in der konventionellen Immunhistochemie – überhaupt keine ICOS-Rezeptor-Expression nachweisbar war, ebenso wie für unbeefallene und befallene Psoriasisishaut – wie in dieser Untersuchung mit der Doppelimmunfluoreszenztechnik gezeigt werden konnte.



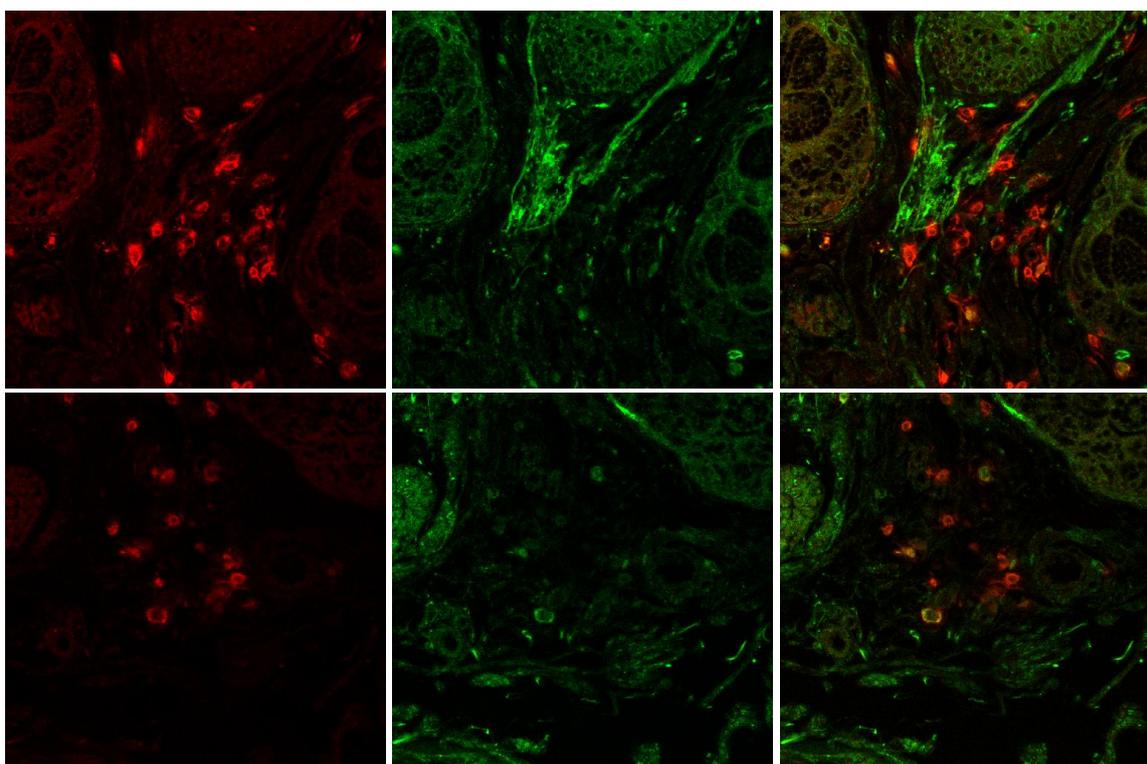
**Abb. 13: Keine Expression von ICOS-Rezeptor auf Mastzellen in unbeefallener Haut von Psoriasispatienten.** Die Abbildung zeigt, dass ICOS-Rezeptor nicht auf Mastzellen in der unbeefallenen Haut von Psoriasispatienten (Gruppe G) exprimiert wird. Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 2 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Tryptase-positive Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, sollten sich gelb darstellen. Es zeigt sich hier eine fehlende Übereinstimmung von ICOS-Rezeptor-Expression und Tryptase-Expression.



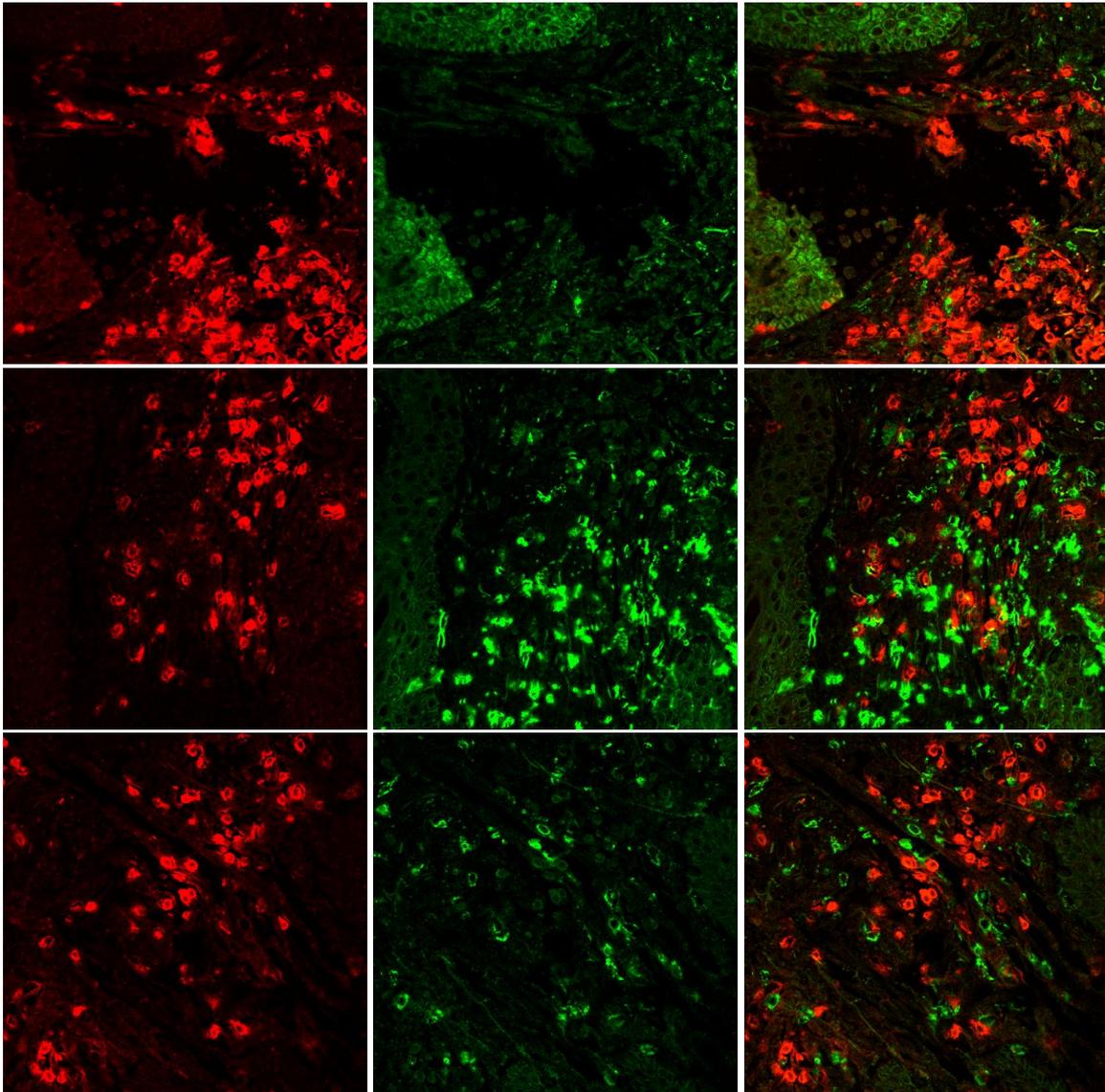
**Abb. 14: Keine Expression von ICOS-Rezeptor auf Mastzellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt, dass ICOS-Rezeptor nicht auf Mastzellen in der befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe P) exprimiert wird. Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 2 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Tryptase-positive Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, sollten sich gelb darstellen. Es zeigt sich hier eine fehlende Übereinstimmung von ICOS-Rezeptor-Expression und Tryptase-Expression.

### III. 7. Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Ebenso sollte durch immunhistochemische Untersuchungen in Doppelfluoreszenztechnik geklärt werden, ob denn T-Zellen in der Haut des Psoriasis-erkrankten den ICOS-Rezeptor exprimieren und ob es Veränderungen in der Verteilung zwischen befallener und unbefallener Haut des Psoriasis-erkrankten gibt. Hierzu wurden Doppelimmunfluoreszenzen für ICOS-Rezeptor und CD2 angefertigt, um die Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen zu untersuchen. CD2 diene also erneut als Marker für T-Zellen. Wie die folgenden Abbildungen 15 und 16 zeigen, konnte auf CD2-positiven Zellen eine nur geringe Expression des ICOS-Rezeptors nachgewiesen werden.



**Abb. 15: Keine signifikante Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in unbefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in der unbefallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 2 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Nur einzelne CD2-positive Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Insgesamt fand sich eine nicht signifikante Koexpression von CD2 und ICOS-Rezeptor.

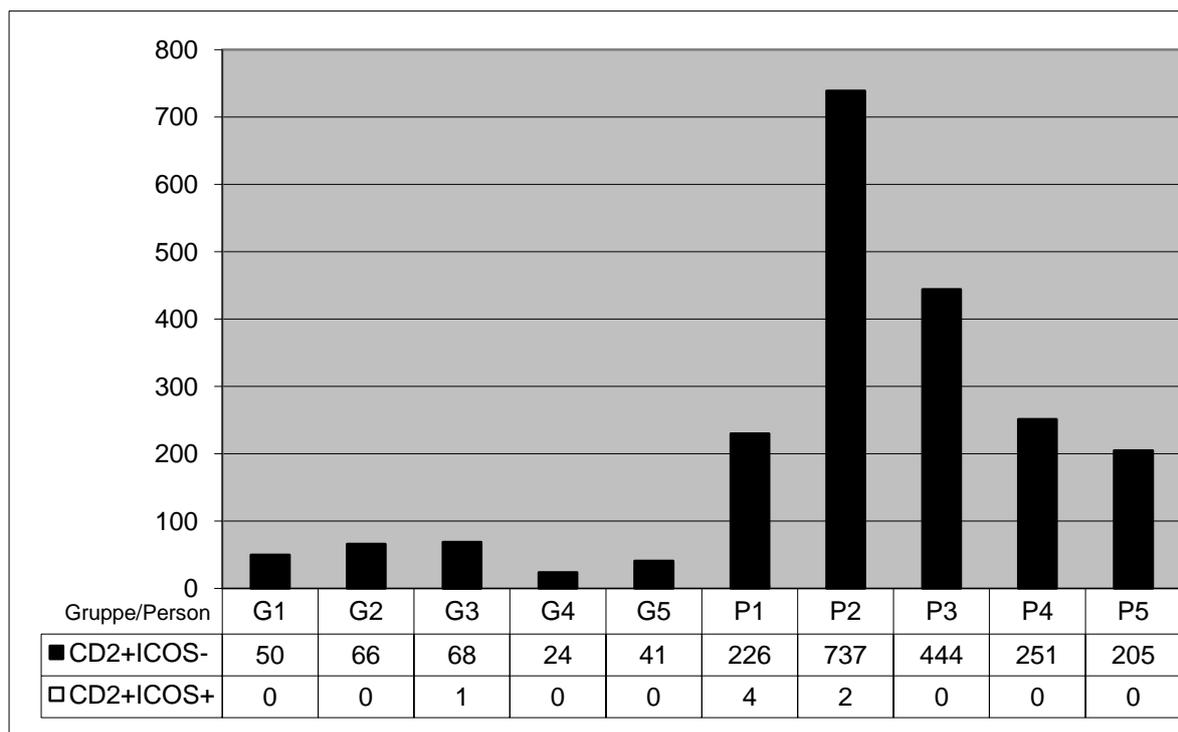


**Abb. 16: Keine signifikante Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in der Psoriasisplaque (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es werden zeilenweise exemplarisch Gewebeschnitte von 3 Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Nahezu keine CD2-positiven Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Insgesamt fand sich eine nicht signifikante Koexpression von CD2 und ICOS-Rezeptor.

In der Haut von gesunden Probanden hatte sich ja bereits in der konventionellen Immunhistochemie keine Expression von ICOS-Rezeptor gefunden. Wie die vorherigen Abbildungen 15 und 16 zeigten, fand sich in den Untersuchungen in Doppelimmunfluoreszenztechnik auf T-Zellen in der befallenen und unbefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten eine nur äußerst geringe Expression von ICOS-Rezeptor. Die im Folgenden dargestellte statistische Auswertung zeigte, dass sich auf CD2-positiven Zellen bei gesunden Kontrollpersonen und in der befallenen und unbefallenen Psoriasis-Haut sich keine signifikante Expression des ICOS-Rezeptors fand. Dies ist in der folgende Tabelle 14 und Abbildung 17 dargestellt. In der statistischen Auswertung konnte bestätigt werden, dass sich keine signifikante Expression von ICOS-Rezeptor auf CD2-positiven Zellen fand.

Gruppe	Person	CD2+	CD2+ICOS+	CD2+ICOS-	%CD2+ICOS+	%CD2+ICOS-
G	1	50	0	50	0,00	100,00
G	2	66	0	66	0,00	100,00
G	3	69	1	68	1,45	98,55
G	4	24	0	24	0,00	100,00
G	5	41	0	41	0,00	100,00
P	1	230	4	226	1,74	98,26
P	2	739	2	737	0,27	99,73
P	3	444	0	444	0,00	100,00
P	4	251	0	251	0,00	100,00
P	5	205	0	205	0,00	100,00

**Tab. 14: Keine signifikante Expression des ICOS-Rezeptors auf T-Zellen in unbefallener und befallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten CD2-positiven Zellen (CD2+), ICOS-Rezeptor-positiven CD2-Zellen (CD2+ICOS+) und der ICOS-Rezeptor-negativen CD2-Zellen (CD2+ICOS-) sowie die relativen Zahlen für ICOS-Rezeptor-positive CD2-Zellen (%CD2+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negative CD2-Zellen (CD2+ICOS-), die an den Schnitte von unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze.



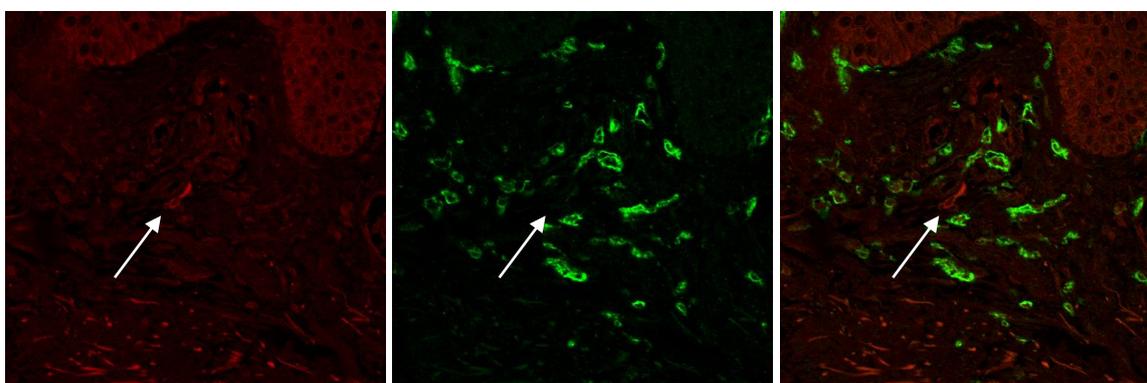
**Abb. 17: Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen in unbeeinträchtigter Haut von Psoriasispatienten und in der Psoriasisplaque.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Die Ordinate zeigt die Zahl der absolut gezählten ICOS-Rezeptor-positiven T-Zellen (CD2+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negativen T-Zellen (CD2+ICOS-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Psoriasispatienten untersucht, denen jeweils eine Stanze aus unbeeinträchtigter Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasisplaque entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

Im t-Test wurde die Expression des ICOS-Rezeptors auf CD2-positiven Zellen in der Gruppe C (gesunde Probanden), Gruppe G (unbeeinträchtigte Haut der Psoriasispatienten) und Gruppe P (Psoriasisplaque) bezüglich signifikanter Unterschiede verglichen. Bei insgesamt nicht signifikanter Expression von ICOS-Rezeptor durch T-Zellen zeigten sich im t-Test für Gruppe G vs. Gruppe P (p-Wert 0,8269), Gruppe G vs. Gruppe C (p-Wert 0,3739) und Gruppe P vs. Gruppe C (p-Wert 0,3008) keine signifikanten Unterschiede in der ICOS-Rezeptor-Expression durch T-Zellen.

### III. 8. Expression von ICOS-Rezeptor auf dendritischen Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Da wir bisher die Mehrzahl der ICOS-exprimierenden Zellen in der Haut der Psoriasispatienten mit der eingesetzten Färbung nicht identifizieren konnten, stellten wir uns erneut die Frage, welche Zellen den ICOS-Rezeptor in der

Psoriasisishaut exprimieren. In der Literatur gab es bisher keine Hinweise auf eine Expression von ICOS-Rezeptor durch dendritische Zellen, doch in der Pathogenese der Psoriasis spielen dendritische Zellen neben T-Zellen und Mastzellen eine zentrale Rolle. Wir wählten daher als Marker für dendritische Zellen das Protein p55, welches im Zuge der Reifung dieser Zellen hochreguliert wird und als Marker für reife dendritische Zellen gilt. Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenztechnik untersuchten wir die ICOS-Rezeptor-Expression auf p55-positiven Zellen. Wie die folgende Abbildung 18 zeigt, fand sich hier in der Psoriasis keine Koexpression, d.h. die dendritischen Zellen in der Psoriasisishaut exprimierten keinen ICOS-Rezeptor.

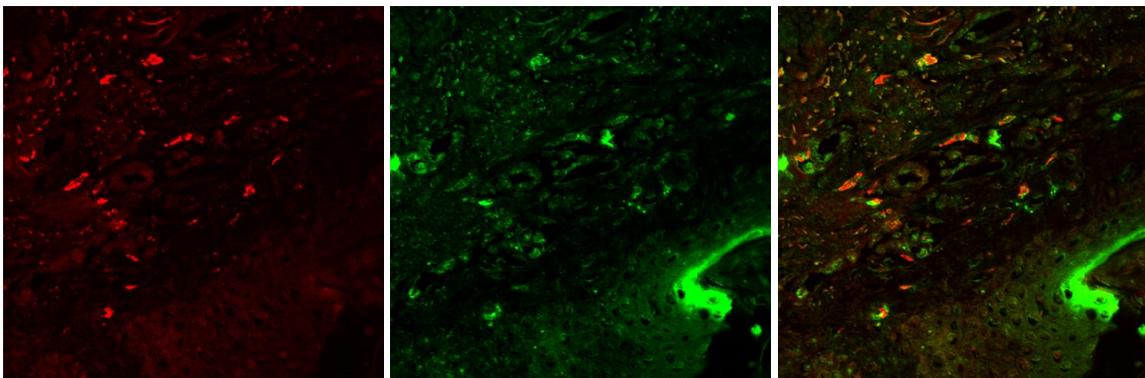


**Abb. 18: Keine Expression von ICOS-Rezeptor auf dendritischen Zellen in der Haut von Psoriasispatienten.** Als Marker für dendritische Zellen wurde p55 gewählt. Die Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung an unbefallener (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von jeweils 5 Psoriasispatienten. Es fand sich keine Koexpression von ICOS-Rezeptor und p55 als Marker für dendritische Zellen. Die Abbildung zeigt exemplarisch den Gewebeschnitt aus einer Psoriasisplaque. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von p55 (rot), eine dendritische Zelle ist mit einem Pfeil hervorgehoben. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten Spalte die Überlagerung der Bilder gezeigt. ICOS-Rezeptor-positive dendritische Zellen sollten sich gelb darstellen. Es zeigt sich keine Koexpression.

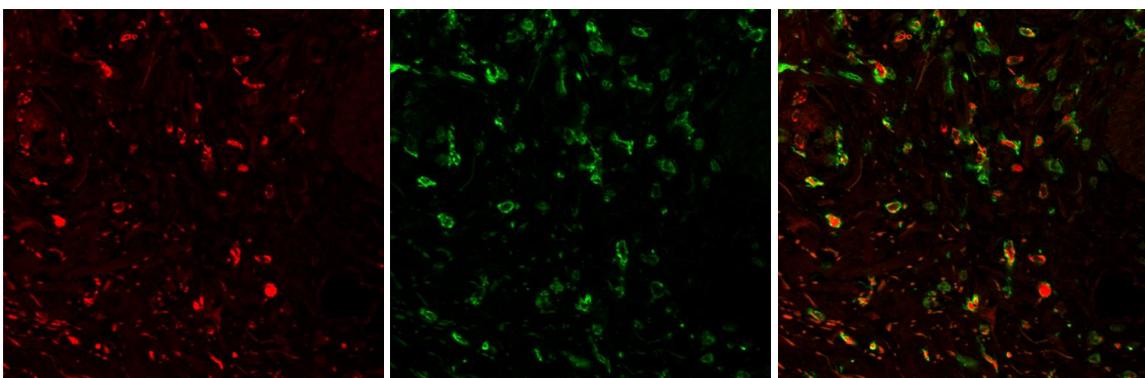
### III. 9. Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Da weiterhin der Großteil der ICOS-Rezeptor-exprimierenden Zellen in der Psoriasisishaut unbekannt war, betrachteten wir erneut die konventionellen ICOS-Rezeptorfärbungen. In den konventionellen Färbungen zeigten eine Vielzahl der ICOS-Rezeptor-positiven Zellen die Morphologie von makrophagozytären Zellen, so dass wir uns entschlossen, eine Doppelimmunfluoreszenzuntersuchung mit KiM1P, einem Marker für Gewebemakrophagen, anzuschließen. Eine Expression von ICOS-Rezeptor durch Makrophagen war bisher nicht bekannt. In der Doppelimmunfluoreszenz für ICOS-Rezeptor und KiM1P zeigte sich eine deutliche

Koexpression. Ein großer Teil der ICOS-Rezeptor-positiven Zellen war auch KiM1P-positiv. Die folgenden Abbildungen 19 und 20 zeigen Bilder dieser Untersuchungen.



**Abb. 19: Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung und wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird exemplarisch der Gewebeschnitt eines Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von KiM1P (rot) als Marker für Makrophagen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. KiM1P-positive Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine Koexpression von KiM1P und ICOS-Rezeptor.

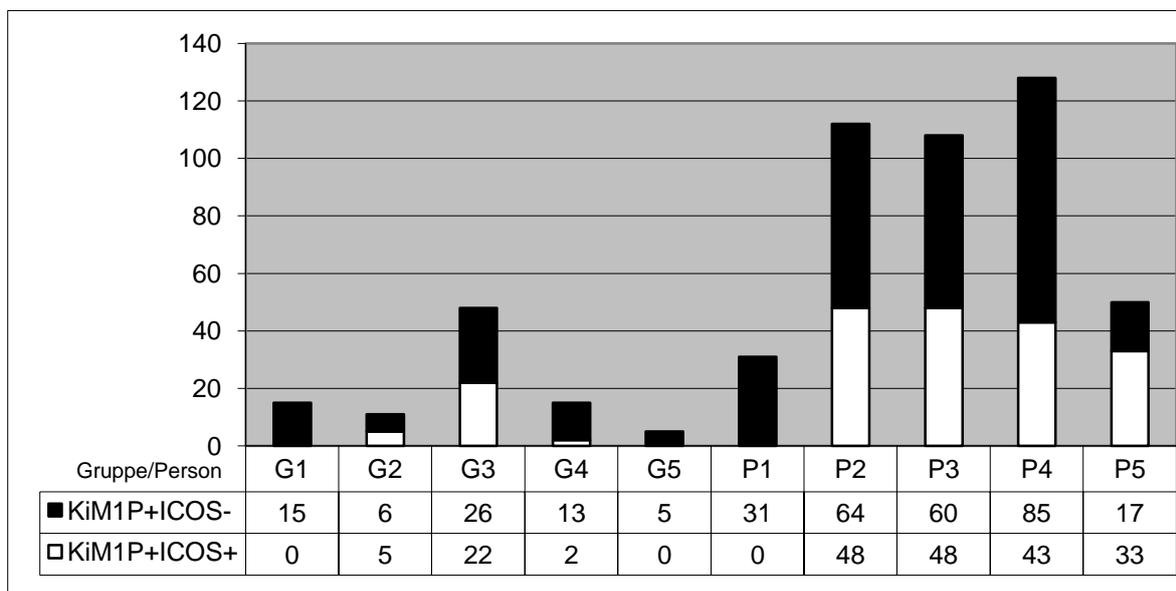


**Abb. 20: Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in der Psoriasisplaque (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung und wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird exemplarisch der Gewebeschnitt eines Erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von KiM1P (rot) als Marker für Makrophagen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Rezeptor (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. KiM1P-positive Zellen, die den ICOS-Rezeptor exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von KiM1P und ICOS-Rezeptor.

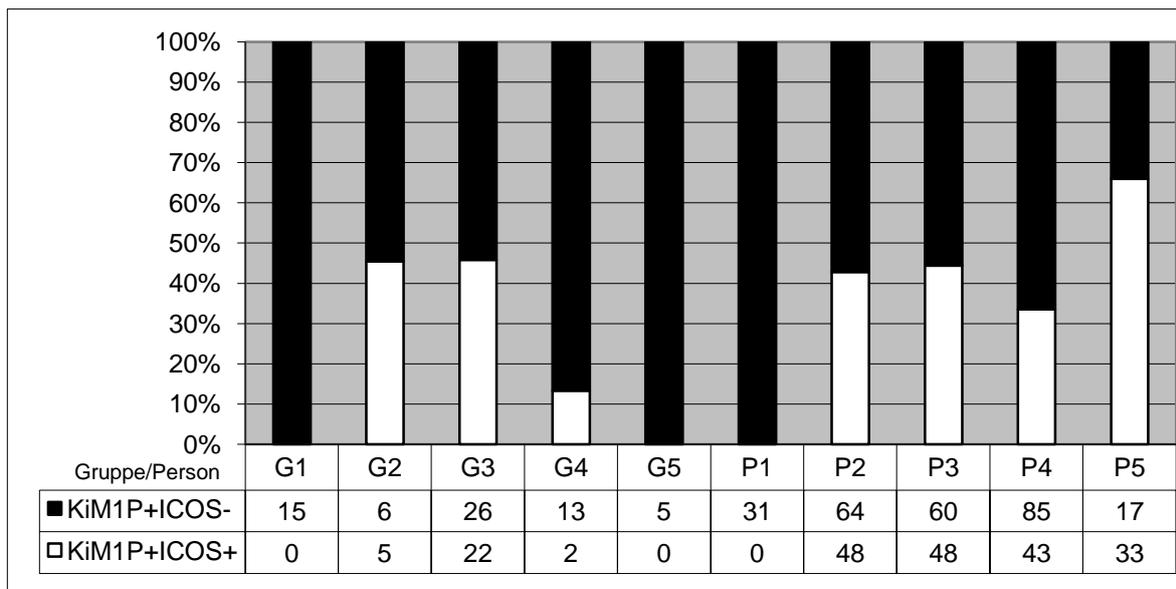
Anhand dieser in Doppelimmunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurde die absolute Anzahl der ICOS-Rezeptor-positiven (KiM1P+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negativen (KiM1P+ICOS-) Gewebemakrophagen sowie der jeweilige relative Anteil ermittelt. Einen Überblick hierüber gibt die folgende Tabelle 15 sowie die folgenden Abbildungen 21 und 22.

Gruppe	Person	KiM1P+	KiM1P+ ICOS+	KiM1P+ ICOS-	%KiM1P+ ICOS+	%KiM1P+ ICOS-
G	1	15	0	15	0,00	100,00
G	2	11	5	6	45,45	54,55
G	3	48	22	26	45,83	54,17
G	4	15	2	13	13,33	86,67
G	5	5	0	5	0,00	100,00
P	1	31	0	31	0,00	100,00
P	2	112	48	64	42,86	57,14
P	3	108	48	60	44,44	55,56
P	4	128	43	85	33,59	66,41
P	5	50	33	17	66,00	34,00

**Tab. 15: Expression des ICOS-Rezeptors auf Makrophagen in der unbefallenen und befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten.** KiM1P wurde als Marker für Makrophagen verwendet. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten KiM1P-positiven Zellen (KiM1P+), ICOS-Rezeptor-positiven KiM1P-Zellen (KiM1P+ICOS+) und der ICOS-Rezeptor-negativen KiM1P-Zellen (KiM1P+ICOS-) sowie die relativen Zahlen für ICOS-Rezeptor-positiv KiM1P-Zellen (%KiM1P+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negativ KiM1P-Zellen (%KiM1P+ICOS-), die an den Schnitten von unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze.



**Abb. 21: Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in unbefallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasisplaque.** KiM1P wurde als Marker für Makrophagen verwendet. Die Ordinate zeigt die Zahl der absolut gezählten ICOS-Rezeptor-positiven Makrophagen (KiM1P+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negativen Makrophagen (KiM1P+ICOS-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Psoriasis-erkrankte untersucht, denen jeweils eine Stanze aus unbefallener Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasisplaque entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.



**Abb. 22: Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasisplaque.** KiM1P wurde als Marker für Makrophagen verwendet. Die Ordinate zeigt die relativen Anteile der ICOS-Rezeptor-positiven Makrophagen (KiM1P+ICOS+) und ICOS-Rezeptor-negativen Makrophagen (KiM1P+ICOS-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Psoriasis-erkrankte untersucht, denen jeweils eine Stanze aus unbeefallener Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasisplaque entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

In der statistischen Auswertung stellten wir die Frage, ob sich die Expression von ICOS-Rezeptor in der Haut von gesunden Probanden (Gruppe C), in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe G) und in der Haut aus der Psoriasisplaque (Gruppe P) signifikant unterscheidet. Die Meanwerte, Varianzen und Konfidenzintervalle sind in Tabelle 16 dargestellt:

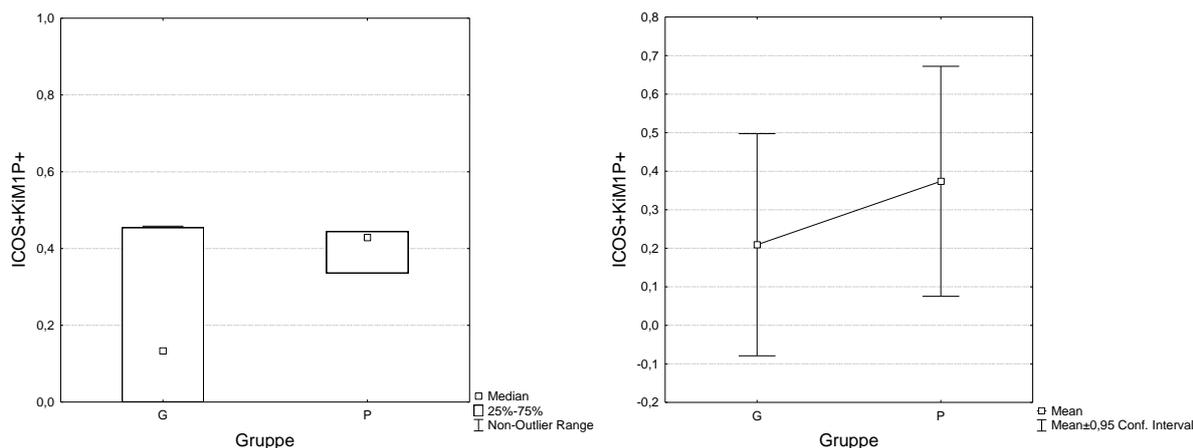
Gruppe	Zelltyp	Molekül	Mean	Varianz	Konfidenzintervall (+/-95%)	
C	KiM1P	ICOS	0,00	0,00	0,00	0,00
G	KiM1P	ICOS	0,21	0,05	-0,08	0,50
P	KiM1P	ICOS	0,37	0,06	0,08	0,67

**Tab. 16: Die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in der Psoriasisplaque unterscheidet sich signifikant von der in der Haut gesunder Probanden, nicht jedoch von der in unbeefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Unbeefallene Haut von Psoriasis-erkrankten und die Haut gesunder Probanden unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant. Dargestellt sind die relativen Zahlen der Expression von ICOS-Rezeptor (ICOS), die an den Schnitten von unbeefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten sowie 5 gesunden Kontrollpersonen (Gruppe C) ermittelt wurden.

Die statistische Untersuchung (Abb. 23, Tab. 17) zeigte, dass in der befallenen Haut (Mean 0,37, Varianz 0,06, Konfidenzintervall 0,08 – 0,67) der Psoriatiker gegenüber der Haut gesunder Probanden (Mean 0,0, Varianz 0,0, Konfidenzintervall 0,0) die

Expression des ICOS-Rezeptors auf Makrophagen signifikant erhöht war (p-Wert 0,0254).

In der unbefallenen Haut der Psoriatiker fand sich eine ICOS-Expression auf Makrophagen (Mean 0,21, Varianz 0,05, Konfidenzintervall -0,08 – 0,5), die sich nicht signifikant von der Expression auf Makrophagen in der Haut gesunder Kontrollpersonen oder in der befallenen Psoriasisshaut unterschied.



**Abb. 23: Die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in der Psoriasisplaque unterscheidet sich signifikant von der auf Makrophagen in der Haut gesunder Probanden.** Die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in unbefallener Haut der Psoriasisserkrankten zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Expression auf Makrophagen in der Haut gesunder Probanden oder in der Psoriasisplaque. Grafische Darstellung der relativen ICOS-Rezeptor-Expression auf Makrophagen (ICOS+KiM1P+) auf der Ordinate mit Angabe des Median bzw. des Mean und des Konfidenzintervalls in der unbefallenen Haut (Gruppe G) und der befallenen Haut (Gruppe P) von fünf Psoriasisserkrankten. In der Haut gesunder Probanden (Gruppe C) fand sich keine Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen. Auf der Abszisse sind die beiden untersuchten Gruppen aufgetragen.

	p-Wert	Interpretation
Gruppe G vs. P	0,19	Nicht signifikant
Gruppe C vs. G	0,114	Nicht signifikant
Gruppe C vs. P	0,025	Signifikant

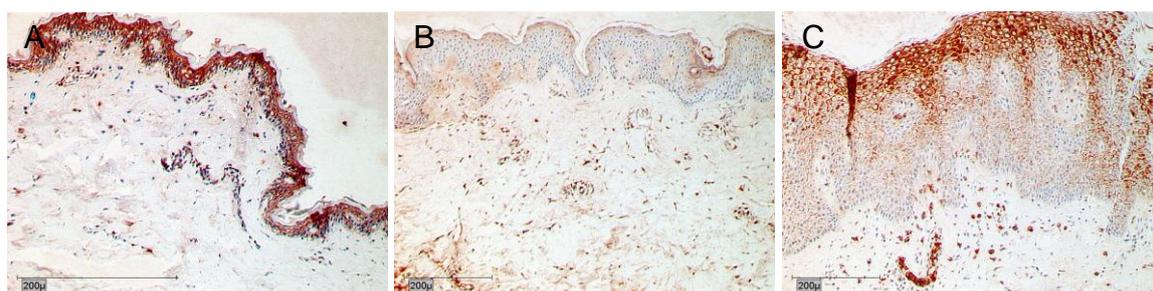
**Tab. 17: Die Expression von ICOS-Rezeptor auf Makrophagen in der Psoriasisplaque unterscheidet sich signifikant von der auf Makrophagen in der Haut gesunder Probanden.** Der t-Test zeigt, dass die Expression von ICOS-Rezeptor auf KiM1P-positiven Gewebemakrophagen in der Psoriasisplaque (Gruppe P) gegenüber der Haut gesunder Probanden (Gruppe C) signifikant erhöht ist. Unbefallene Haut (Gruppe G) zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Haut gesunder Probanden (Gruppe C) oder zur Psoriasisplaque (Gruppe P).

### III. 10. Expression von ILA- und ICOS-Ligand beim Gesunden und bei Psoriasis-erkrankten in konventionellen immunhistochemischen Färbungen

Nach erfolgter Untersuchung der Expression von ILA- und ICOS-Rezeptor stellte sich nun die Frage nach der Expression der zugehörigen Liganden. Für den ILA-Liganden (Abb. 24) und für den ICOS-Liganden (Abb. 25) zeigte sich in den konventionellen immunhistochemischen Färbungen eine deutliche Expression. Für den ILA-Liganden und den ICOS-Liganden färbt sich auch die Epidermis an, für den ILA-Liganden stellen sich auch Endothelzellen positiv dar. Als Hauptbefund sind die die Dermis infiltrierenden Entzündungszellen zu sehen. Mit zunehmender Zellzahl im Rahmen der entzündlichen Infiltration der Psoriasisplaque nimmt auch die Expression der Liganden zu.



**Abb. 24: Expression von ILA-Ligand im Gewebeschnitt von gesunden Probanden (A), unbeeinträchtigter Haut von Psoriasis-erkrankten (B) und in der Psoriasisplaque (C).** In die Dermis infiltrierende Entzündungszellen exprimieren den ILA-Liganden. Auch die Epidermis sowie Endothelzellen stellen sich positiv dar. Die Untersuchungen wurden an Hautbiopsien von jeweils 5 Individuen durchgeführt.

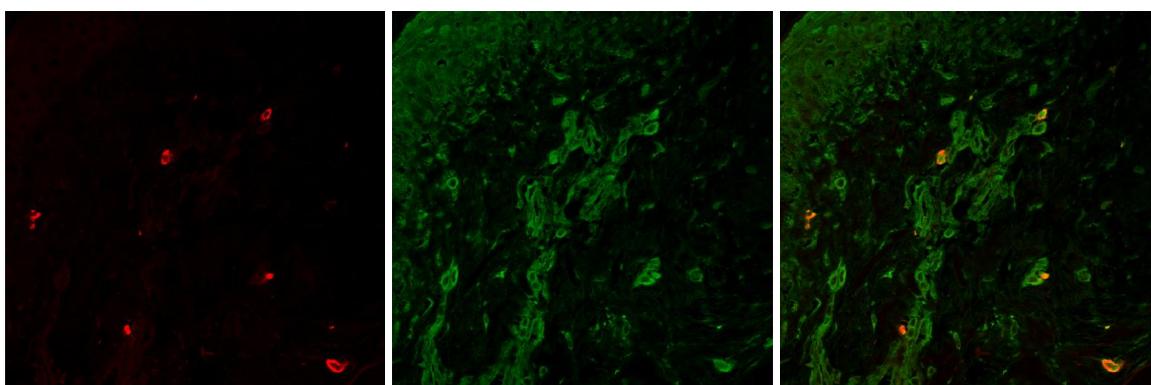


**Abb. 25: Expression von ICOS-Ligand im Gewebeschnitt von gesunden Probanden (A), unbeeinträchtigter Haut von Psoriasis-erkrankten (B) und in der Psoriasisplaque (C).** In die Dermis infiltrierende Entzündungszellen exprimieren den ICOS-Liganden. Auch die Epidermis stellt sich positiv dar. Die Untersuchungen wurden an Hautbiopsien von jeweils 5 Individuen durchgeführt.

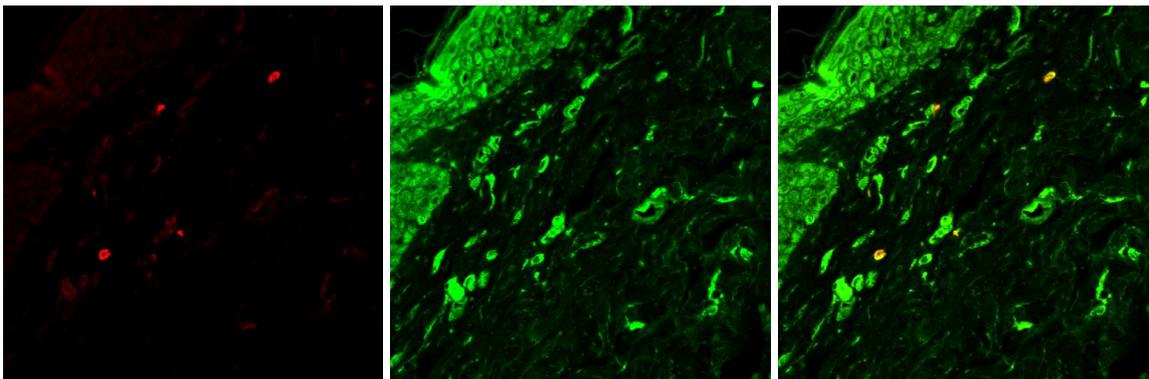
### III. 11. Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Mittels Doppelimmunfluoreszenztechnik wurde auch die Expression von ILA- und ICOS-Liganden auf Mastzellen und T-Zellen untersucht.

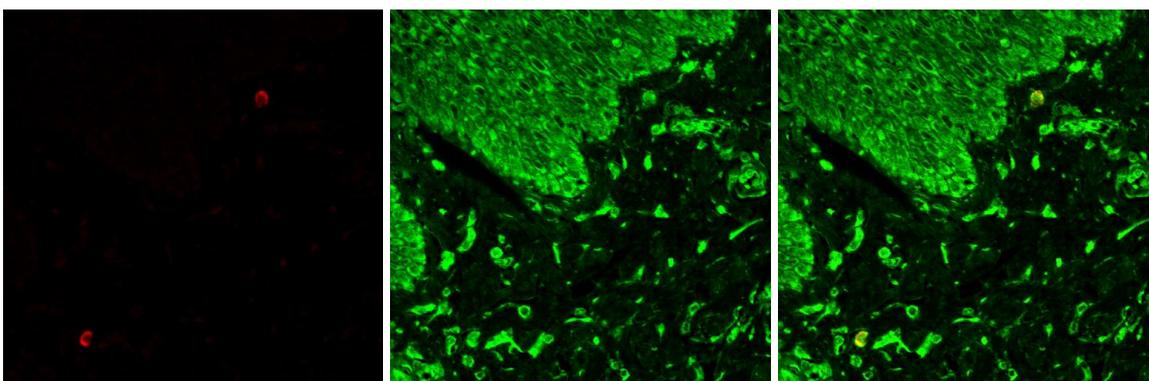
Für den ILA-Liganden fand sich auf sämtlichen Mastzellen eine Expression sowohl in der Haut der Kontrollgruppe als auch in der unbefallenen und befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten. Da sich auf allen Mastzellen eine Expression des ILA-Liganden fand, werden die Auszählungsergebnisse nicht dargestellt. Abbildungen 26, 27 und 28 zeigen Bilder der Doppelimmunfluoreszenzen aus dieser Untersuchung.



**Abb. 26: Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der Haut gesunder Probanden.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der Haut gesunder Probanden (Gruppe C). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt eines Probanden gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ILA-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ILA-Ligand.



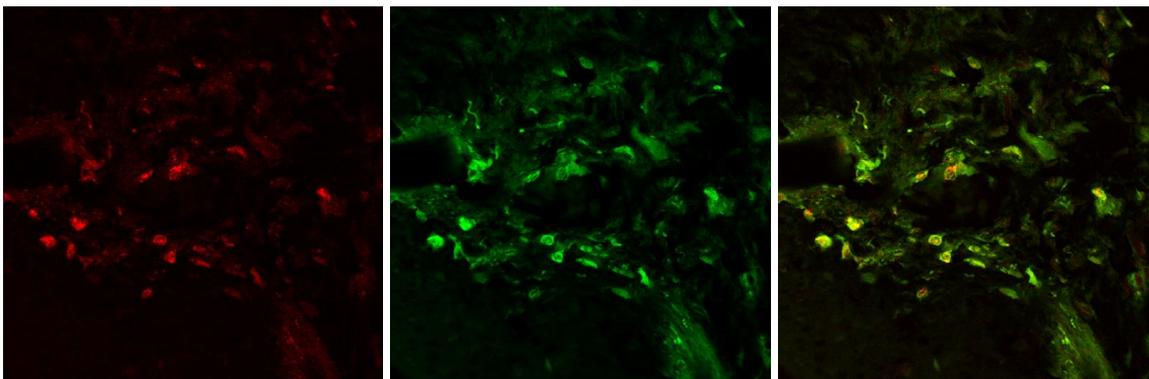
**Abb. 27: Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der unbeefallenen Haut von Psoriasispatienten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der unbeefallenen Haut von Psoriasispatienten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus unbeefallener Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ILA-Ligand exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ILA-Ligand.



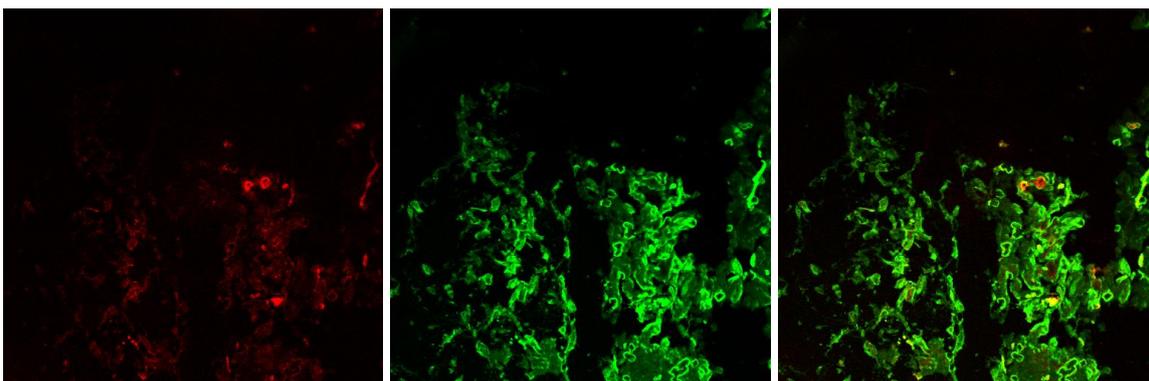
**Abb. 28: Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf Mastzellen in der befallenen Haut von Psoriasispatienten (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus befallener Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ILA-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ILA-Ligand.

### III. 12. Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

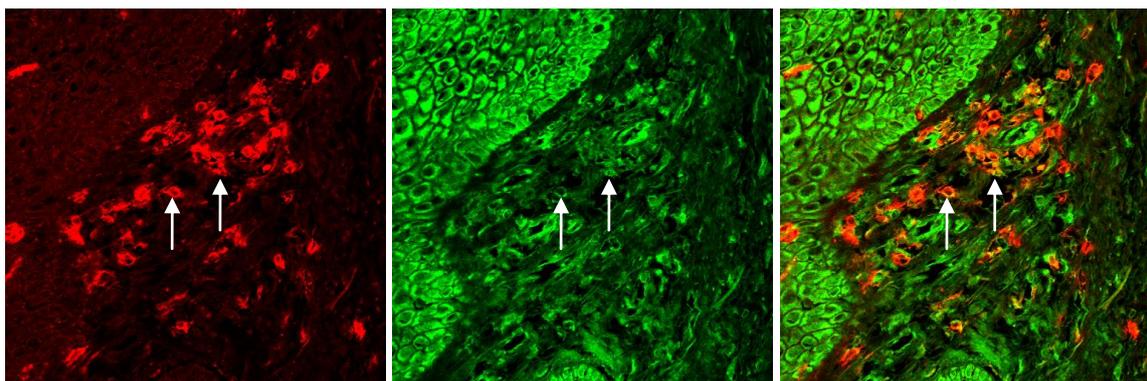
Auf T-Zellen war die Expression von ILA-Ligand nicht derart homogen. Bilder aus der Doppelimmunfluoreszenz finden sich in den Abbildungen 29, 30 und 31. Die Ergebnisse der Auswertung nach Zählung sind in der folgenden Tabelle 18 und Abbildungen 32 und 33 dargestellt.



**Abb. 29: Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden (Gruppe C). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird exemplarisch der Gewebeschnitt eines Probanden gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. T-Zellen, die den ILA-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von CD2 und ILA-Ligand.



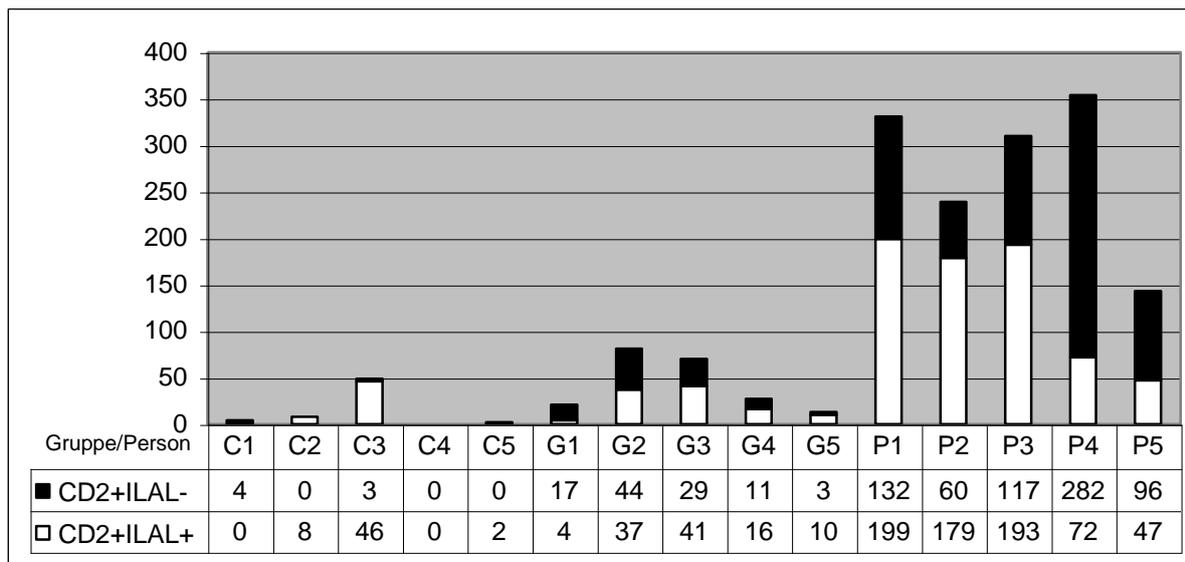
**Abb. 30: Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasispatienten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasispatienten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird exemplarisch ein Gewebeschnitt aus der unbeeinträchtigten Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. T-Zellen, die den ILA-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von CD2 und ILA-Ligand.



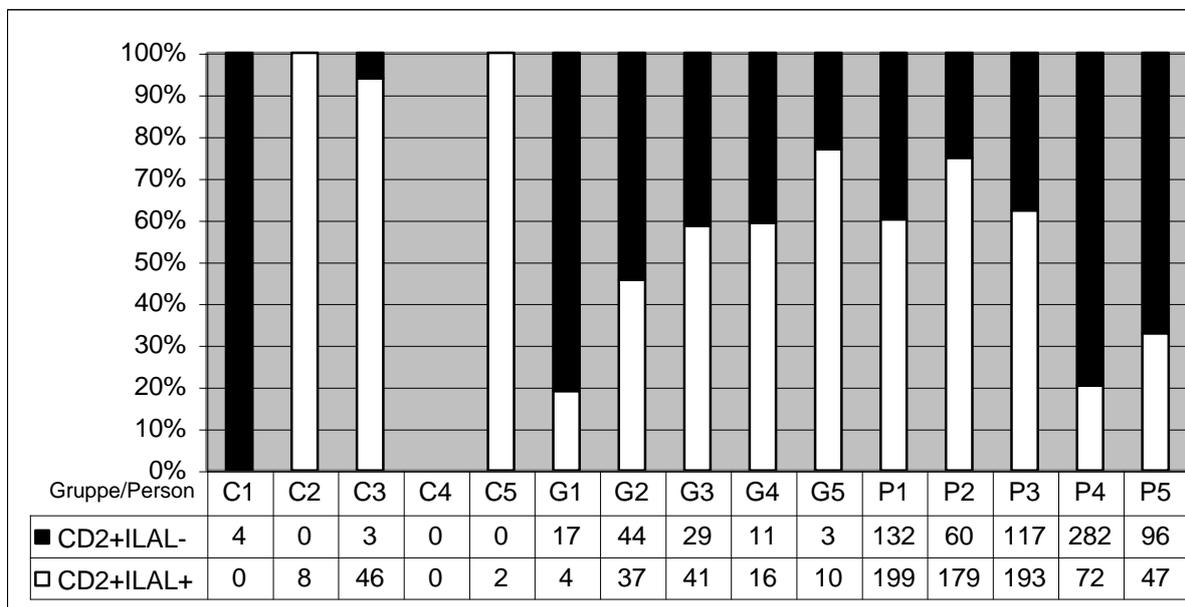
**Abb. 31: Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus der befallenen Haut eines Psoriasis-erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ILA-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. T-Zellen, die den ILA-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von CD2 und ILA-Ligand. Mit Pfeilen sind zwei deutlich doppelt positive Zellen beispielhaft herausgehoben.

Gruppe	Person	CD2+	CD2+ILAL+	CD2+ILAL-	%CD2+ILAL+	%CD2+ILAL-
C	1	4	0	4	0,00	100,00
C	2	8	8	0	100,00	0,00
C	3	49	46	3	93,88	6,12
C	4	0	0	0	0	0
C	5	2	2	0	100,00	0,00
G	1	21	4	17	19,05	80,95
G	2	81	37	44	45,68	54,32
G	3	70	41	29	58,57	41,43
G	4	27	16	11	59,26	40,74
G	5	13	10	3	76,92	23,08
P	1	331	199	132	60,12	39,88
P	2	239	179	60	74,90	25,10
P	3	310	193	117	62,26	37,74
P	4	354	72	282	20,34	79,66
P	5	143	47	96	32,87	67,13

**Tab. 18: Expression des ILA-Liganden auf T-Zellen.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten T-Zellen (CD2+), ILA-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ILAL+) und der ILA-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ILAL-) sowie die relativen Zahlen für ILA-Ligand-positiv T-Zellen (%CD2+ILAL+) und ILA-Ligand-negativ T-Zellen (%CD2+ILAL-), die an den Schnitten von Haut 5 gesunder Probanden (Gruppe C), unbeefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze.



**Abb. 32: Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in Haut gesunder Probanden sowie in unebfallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasis-Plaue.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Die Ordinate zeigt die Zahl der absolut gezählten ILA-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ILAL+) und ILA-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ILAL-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Probanden (Gruppe C) untersucht bzw. 5 Psoriasis-erkrankte, denen jeweils eine Stanze aus unebfallener Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasis-Plaue entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (C1-C5, G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

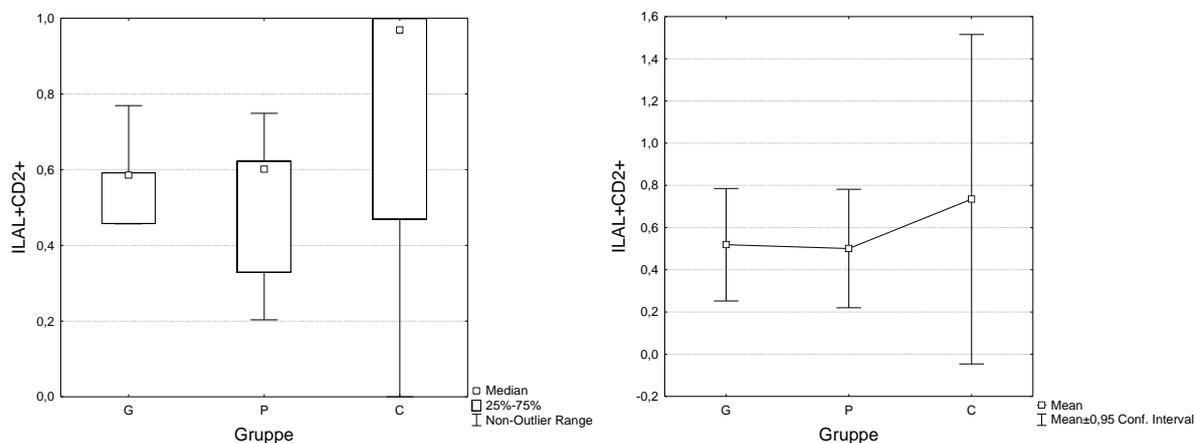


**Abb. 33: Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in Haut gesunder Probanden sowie in unebfallener Haut von Psoriasis-erkrankten und in der Psoriasis-Plaue.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Die Ordinate zeigt die relativen Anteile der ILA-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ILAL+) und ILA-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ILAL-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Probanden (Gruppe C) untersucht bzw. 5 Psoriasis-erkrankte, denen jeweils eine Stanze aus unebfallener Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasis-Plaue entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (C1-C5, G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

Die statistische Auswertung der Expression des ILA-Liganden auf T-Zellen wird in der folgenden Tabelle 19 und Abbildung 34 dargestellt. Auf T-Zellen war die Expression von ILA-Ligand mit einem Mean von 0,73 (Varianz 0,24, Konfidenzintervall -0,05 – 1,52) in der Kontrollgruppe der gesunden Probanden (Gruppe C) hoch. In unbeefallener Haut (Gruppe G) war die Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen mit einem Mean von 0,52 (Varianz 0,05, Konfidenzintervall 0,25 – 0,79) und in befallener Haut (Gruppe P) mit einem Mean von 0,50 (Varianz 0,05, Konfidenzintervall 0,22 – 0,78) geringer. Bei einem p-Wert von 0,6553 sind die Unterschiede in der Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen zwischen den einzelnen Gruppen jedoch nicht signifikant.

Gruppe	Zelltyp	Molekül	Mean	Varianz	Konfidenzintervall (+/-95%)	
C	CD2	ILAL	0,73	0,24	-0,05	1,52
G	CD2	ILAL	0,52	0,05	0,25	0,79
P	CD2	ILAL	0,50	0,05	0,22	0,78

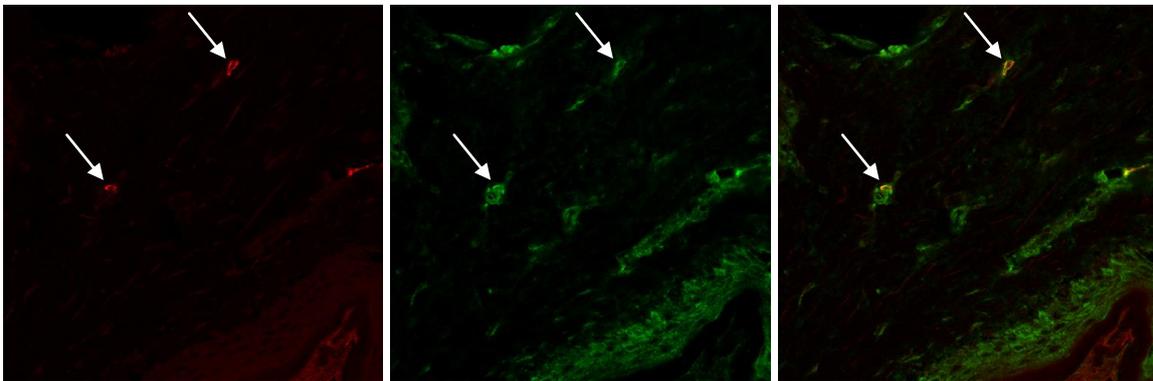
**Tab. 19: Expression des ILA-Liganden auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden und in der unbeefallenen und befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die relativen Zahlen der Expression von ILA-Ligand, die an den Gewebeschnitten von gesunden Probanden (Gruppe C) sowie aus unbeefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Es wurden jeweils 5 Individuen untersucht.



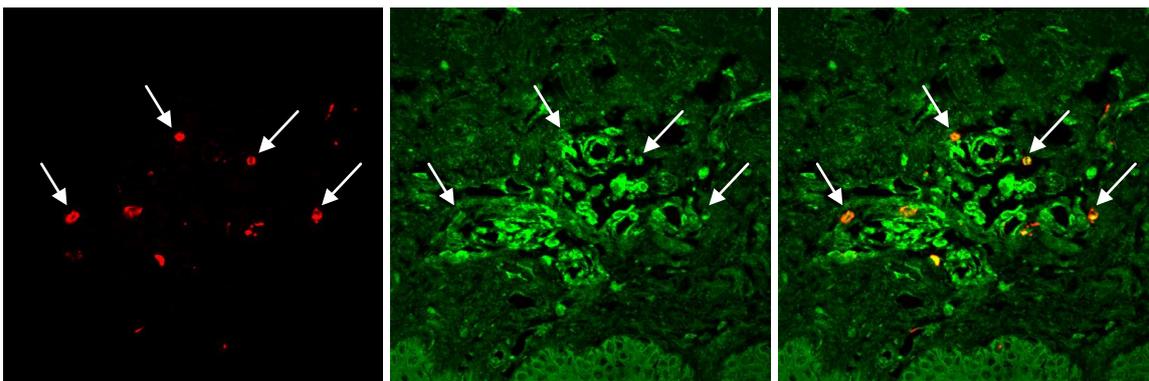
**Abb. 34: Keine statistische Signifikanz in der Expression von ILA-Ligand auf T-Zellen in der Haut von gesunden Probanden, unbeefallener und befallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Der p-Wert beträgt 0,6553. Grafische Darstellung der relativen ILA-Ligand-Expression auf T-Zellen (ILAL+CD2+) auf der Ordinate mit Angabe des Median- bzw. Mean-Wertes und des Konfidenzintervalls für die Haut gesunder Probanden (Gruppe C) und für die unbeefallene Haut (Gruppe G) und befallene Haut (Gruppe P) von Psoriasis-erkrankten. Auf der Abszisse sind die untersuchten Gruppen aufgetragen.

### III. 13. Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

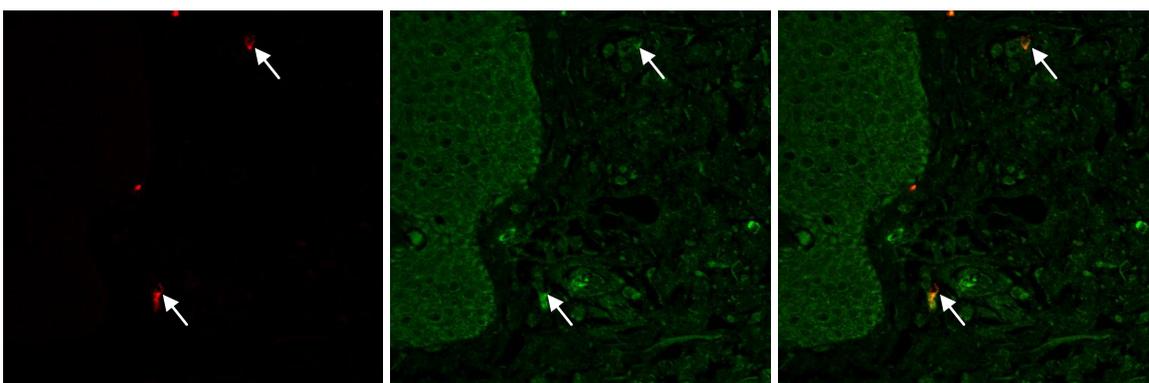
Für den ICOS-Liganden fand sich auf Mastzellen ebenfalls eine Expression. Wie für den ILA-Liganden auf Mastzellen fand sich auch für den ICOS-Liganden eine Expression auf allen Mastzellen, die mit Tryptase als Zellmarker detektiert wurden. Die Auszählungsergebnisse werden daher nicht dargestellt. Dies galt für alle untersuchten Gruppen, also sowohl für gesunde Probanden als auch für unbefallene und befallene Haut von Psoriasis-erkrankten. Bilder aus diesen Untersuchungen mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen sind in den folgenden Abbildungen 35, 36 und 37 gezeigt.



**Abb. 35: Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der Haut gesunder Probanden.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der Haut gesunder Probanden (Gruppe C). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt eines Probanden gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ICOS-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ICOS-Ligand. Mit Pfeilen sind zwei deutlich doppelt positive Zellen herausgehoben.



**Abb. 36: Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der unbeefallenen Haut von Psoriasispatienten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der unbeefallenen Haut von Psoriasispatienten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus unbeefallener Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ICOS-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ICOS-Ligand. Mit Pfeilen sind vier deutlich doppelt positive Zellen beispielhaft herausgehoben.

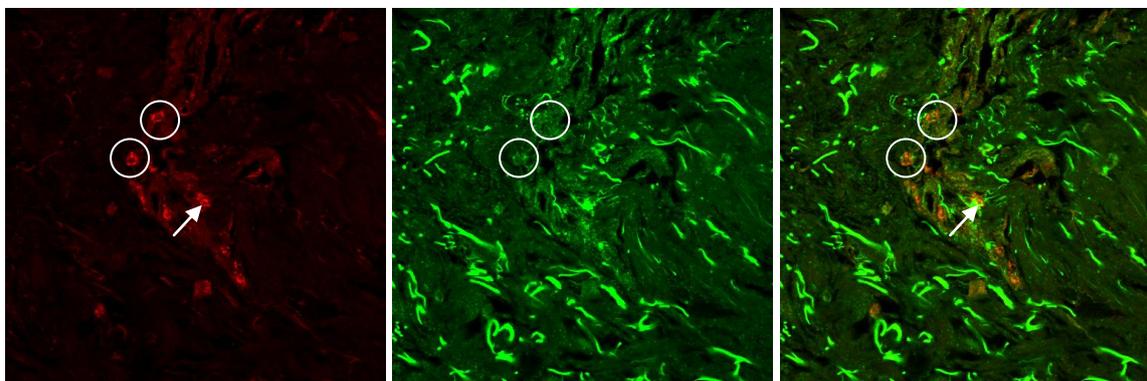


**Abb. 37: Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf Mastzellen in der befallenen Haut von Psoriasispatienten (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus befallener Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von Tryptase (rot) als Marker für Mastzellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Mastzellen, die den ICOS-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar. Es findet sich eine deutliche Koexpression von Tryptase und ICOS-Ligand. Mit Pfeilen sind zwei deutlich doppelt positive Zellen herausgehoben.

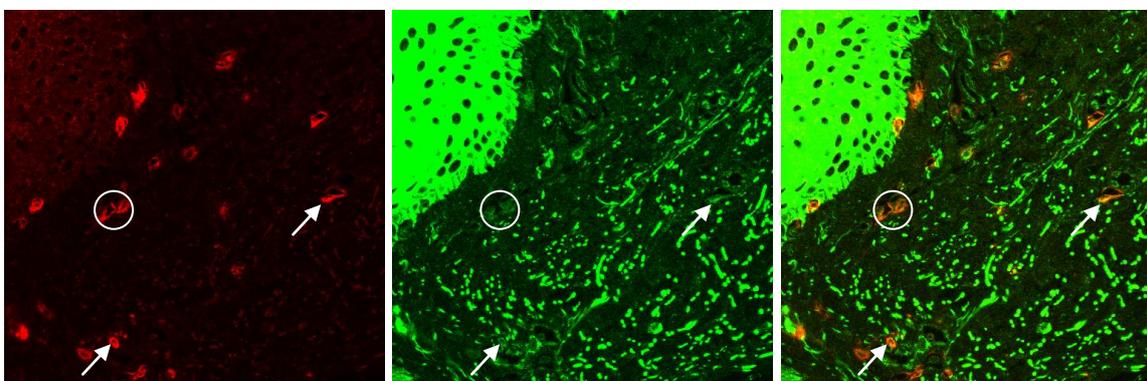
### III. 14. Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Auf T-Zellen fand sich nur eine teilweise Expression von ICOS-Ligand in der Haut gesunder Probanden sowie in unbeefallener Haut von Psoriasispatienten. Fotos von den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen finden sich in den Abbildungen 38, 39 und

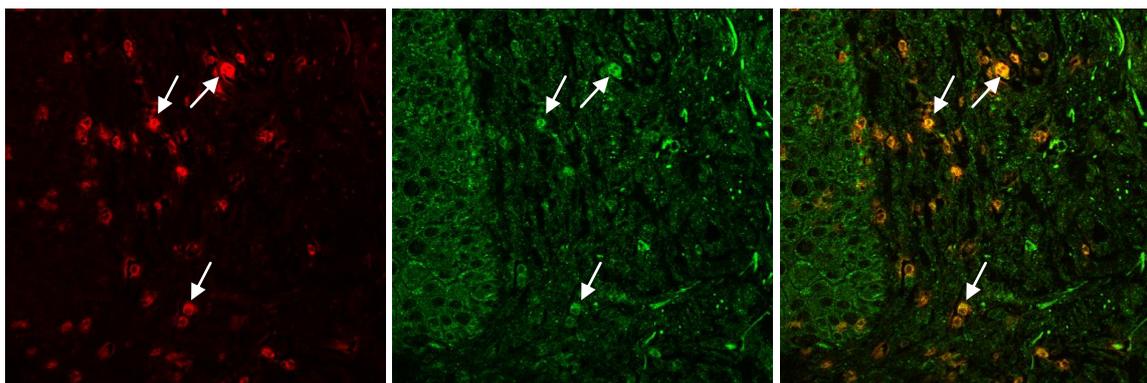
40. In einigen Psoriasisplaques exprimierten viele T-Zellen den ICOS-Liganden. Eine Übersicht über die gezählten Zellen in tabellarischer und grafischer Ansicht geben die Tabelle 20 und Abbildungen 41 und 42.



**Abb. 38: Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden (Gruppe C). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt eines Probanden gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Es finden sich wenige T-Zellen, die den ICOS-Liganden deutlich exprimieren und sich gelb gefärbt darstellen (exemplarisch mit einem Pfeil markiert). Einige Zellen erscheinen rot-orange (exemplarisch mit Kreisen markiert) möglicherweise aufgrund des Hintergrundes oder einer nur schwachen ICOS-Ligand-Expression.



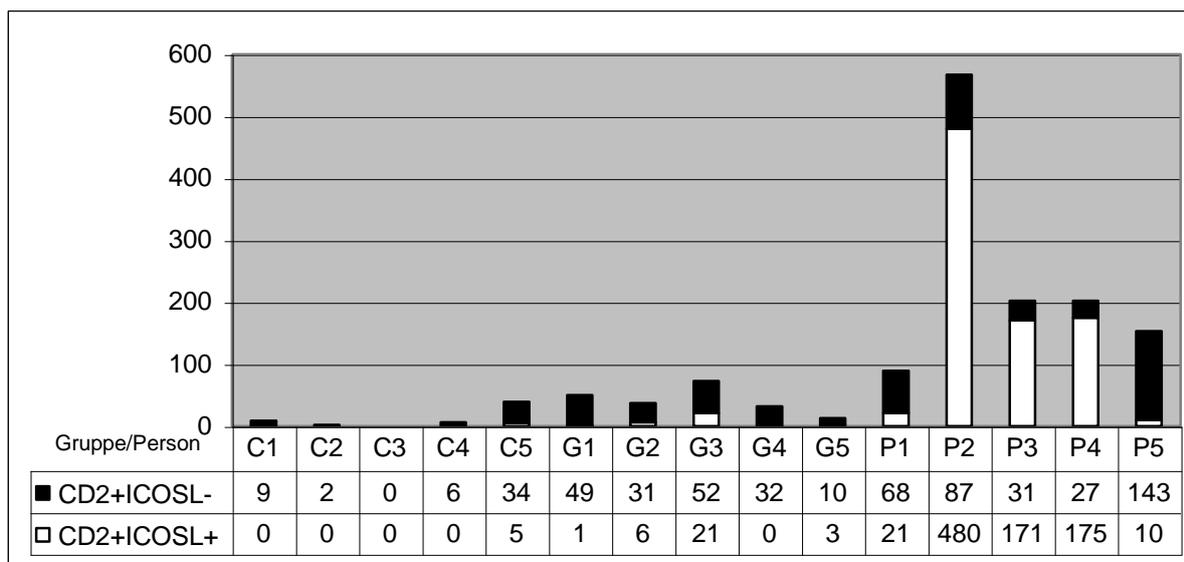
**Abb. 39: Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasispatienten.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der unbeeinträchtigten Haut von Psoriasispatienten (Gruppe G). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus der unbeeinträchtigten Haut eines Psoriasispatienten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. Es finden sich wenige T-Zellen, die den ICOS-Liganden deutlich exprimieren und sich gelb gefärbt darstellen (exemplarisch mit Pfeilen markiert). Einige Zellen erscheinen rot-orange (exemplarisch mit Kreisen markiert) möglicherweise aufgrund des Hintergrundes oder einer nur schwachen ICOS-Ligand-Expression.



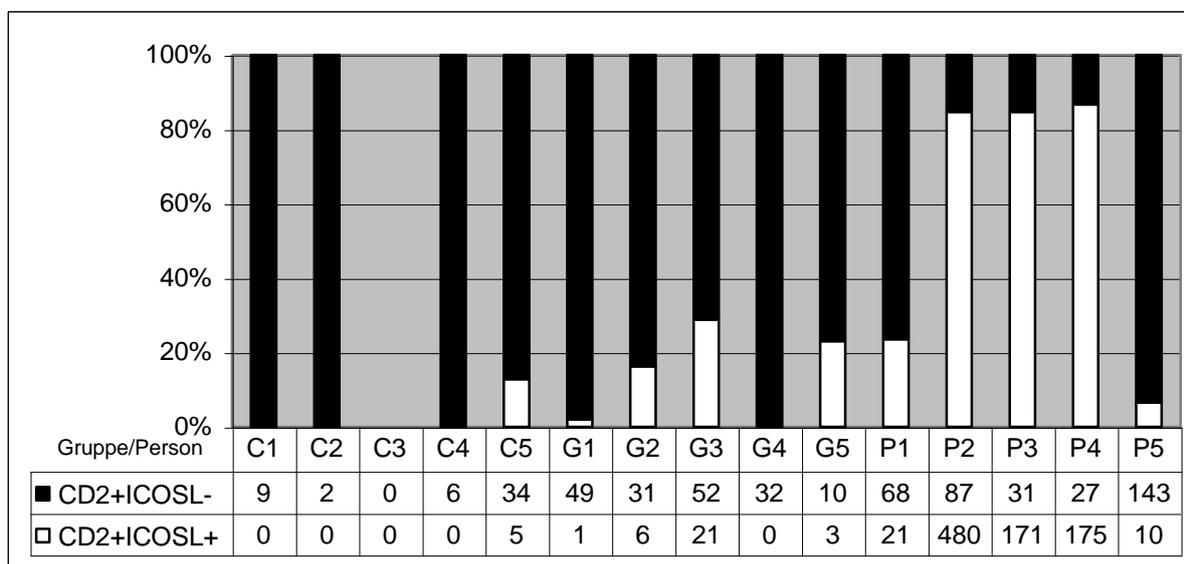
**Abb. 40: Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der Psoriasisplaque.** Die Abbildung zeigt die Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der befallenen Haut von Psoriasis-erkrankten (Gruppe P). Die Auswertung der Untersuchung in Doppelimmunfluoreszenz erfolgte in konfokaler Lasermikroskopie in 400facher Vergrößerung. Die Untersuchung wurde an 5 Individuen durchgeführt. Es wird in einer Zeile exemplarisch der Gewebeschnitt aus der befallenen Haut eines Psoriasis-erkrankten gezeigt. Die erste senkrechte Spalte zeigt die Expression von CD2 (rot) als Marker für T-Zellen. Die zweite senkrechte Spalte zeigt die Expression von ICOS-Ligand (grün). Zur Prüfung der Übereinstimmung wird in der dritten senkrechten Spalte eine Überlagerung der Bilder gezeigt. T-Zellen, die den ICOS-Liganden exprimieren, stellen sich gelb gefärbt dar (exemplarisch mit Pfeilen markiert).

Gruppe	Person	CD2+	CD2+ICOSL+	CD2+ICOSL-	%CD2+ICOSL+	%CD2+ICOSL-
C	1	9	0	9	0,00	100,00
C	2	2	0	2	0,00	100,00
C	3	0	0	0	0	0
C	4	6	0	6	0,00	100,00
C	5	39	5	34	12,82	87,18
G	1	50	1	49	2,00	98,00
G	2	37	6	31	16,22	83,78
G	3	73	21	52	28,77	71,23
G	4	32	0	32	0,00	100,00
G	5	13	3	10	23,08	76,92
P	1	89	21	68	23,60	76,40
P	2	567	480	87	84,66	15,34
P	3	202	171	31	84,65	15,35
P	4	202	175	27	86,63	13,37
P	5	153	10	143	6,54	93,46

**Tab. 20: Expression des ICOS-Liganden auf T-Zellen in der Haut von gesunden Probanden sowie in der unbefallenen Haut und in der Psoriasisplaque von Psoriasis-erkrankten.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten T-Zellen (CD2+), ICOS-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ICOSL+) und der ICOS-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ICOSL-) sowie die relativen Zahlen für ICOS-Ligand-positiv T-Zellen (%CD2+ICOSL+) und ICOS-Ligand-negative T-Zellen (%CD2+ICOSL-), die an den Schnitten von der Haut 5 gesunder Probanden (Gruppe C), unbefallener Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von 5 Psoriasis-erkrankten ermittelt wurden. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanze.



**Abb. 41: Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in Haut gesunder Probanden sowie in unbeeinträchtigter Haut von Psoriasispatienten und in der Psoriasisplaque.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Die Ordinate zeigt die Zahl der absolut gezählten ICOS-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ICOSL+) und ICOS-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ICOSL-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Probanden (Gruppe C) untersucht bzw. 5 Psoriasispatienten, denen jeweils eine Stanze aus unbeeinträchtigter Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasisplaque entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (C1-C5, G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

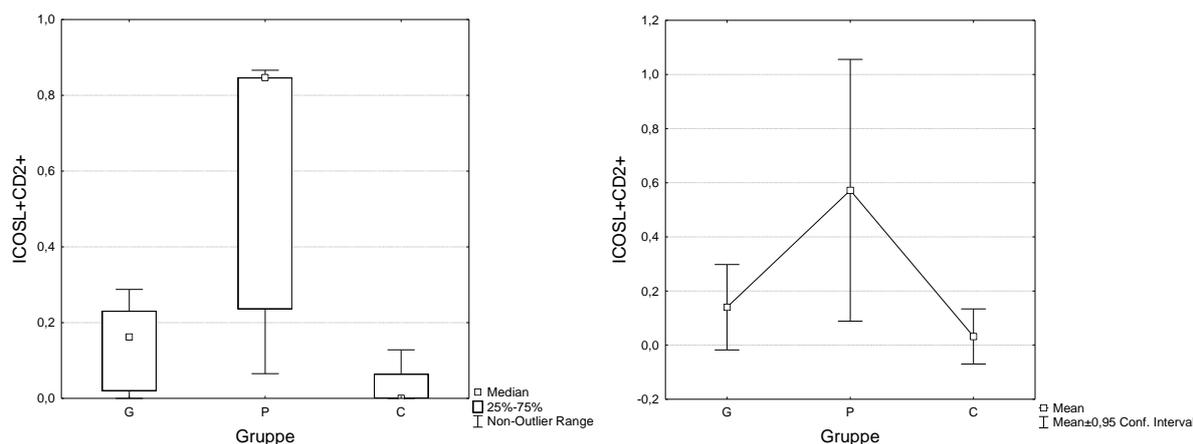


**Abb. 42: Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in Haut gesunder Probanden sowie in unbeeinträchtigter Haut von Psoriasispatienten und in der Psoriasisplaque.** CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Die Ordinate zeigt die relativen Anteile der ICOS-Ligand-positiven T-Zellen (CD2+ICOSL+) und ICOS-Ligand-negativen T-Zellen (CD2+ICOSL-) pro Schnitt. Es wurden jeweils 5 Probanden (Gruppe C) untersucht bzw. 5 Psoriasispatienten, denen jeweils eine Stanze aus unbeeinträchtigter Haut, die der Gruppe G zugeordnet wurde, und eine Stanze aus einer Psoriasisplaque entnommen wurde, die der Gruppe P zugeordnet wurde. Ausgewertet wurde jeweils die gesamte Schnittfläche der 4mm-Stanzen. Diese einzelnen Schnitte sind auf der Abszisse dargestellt (C1-C5, G1-G5, P1-P5). Die Zahlentabelle im untersten Bereich der Graphik gibt eine Übersicht über die absoluten Zahlen der gezählten Zellen.

Auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden und in unbeeinträchtigter Haut von Psoriasispatienten fand sich eine nur geringe Expression von ICOS-Ligand, wie in den vorherigen Tabellen und Abbildungen aufgezeigt wurde. Es fanden sich wenig eindeutig doppelt positive Zellen, die eine deutliche Expression sowohl von CD2 als auch ICOS-Ligand zeigten und somit in der Überlagerung der Bilder der Immunfluoreszenzen gelb erschienen. Nur diese Zellen wurden als doppelt positiv gewertet. Möglicherweise aufgrund des Hintergrundes oder einer vergleichsweise geringen Expression von ICOS-Ligand stellten sich einige T-Zellen in der Überlagerung rot-orange dar. Diese Zellen wurden als negativ gewertet. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (p-Wert 0,1026) fanden sich nicht, wobei als Trend erkennbar war, dass T-Zellen in befallener Haut (Mean 0,57, Varianz 0,15, Konfidenzintervall 0,09 – 1,06) eine verstärkte Expression des ICOS-Liganden gegenüber Kontrollpersonen (Mean 0,03, Varianz 0,0, Konfidenzintervall -0,07 – 0,13) und gegenüber der unbeeinträchtigten Psoriasis-Haut (Mean 0,14, Varianz 0,02, Konfidenzintervall -0,02 – 0,3) zeigten. In der folgenden Tabelle 21 und Abbildung 43 sind diese Daten zusammengefasst.

Gruppe	Zelltyp	Molekül	Mean	Varianz	Konfidenzintervall (+/-95%)	
C	CD2	ICOSL	0,03	0,00	-0,07	0,13
G	CD2	ICOSL	0,14	0,02	-0,02	0,30
P	CD2	ICOSL	0,57	0,15	0,09	1,06

**Tab. 21: Expression des ICOS-Liganden auf T-Zellen in der Haut von gesunden Probanden sowie in unbeeinträchtigter und befallener Haut von Psoriasispatienten.** Es findet sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (p-Wert 0,126). Jedoch ist als Trend erkennbar, dass T-Zellen in befallener Haut eine verstärkte Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen zeigen. CD2 wurde als Marker für T-Zellen verwendet. Dargestellt sind die relativen Zahlen der Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen, die an den Gewebeschnitten von Haut gesunder Probanden (Gruppe C) sowie von unbeeinträchtigter Haut (Gruppe G) und befallener Haut (Gruppe P) von Psoriasispatienten ermittelt wurden. Es wurden jeweils 5 Individuen untersucht.



**Abb. 43: Keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden, in unbeefallener und beefallener Haut von Psoriasis-erkrankten.** Der p-Wert beträgt 0,126. Jedoch ist als Trend erkennbar, dass T-Zellen in beefallener Haut eine verstärkte Expression von ICOS-Ligand auf T-Zellen zeigen. Grafische Darstellung der relativen ICOS-Liganden-Expression auf T-Zellen (ICOSL+CD2+) auf der Ordinate mit Angabe des Median- bzw. des Mean-Wertes und des Konfidenzintervalls für die Haut gesunder Probanden (Gruppe C), unbeefallene Haut (Gruppe G) und beefallene Haut (Gruppe P) von Psoriasis-erkrankten. Auf der Abszisse sind die untersuchten Gruppen aufgetragen.

### III. 15. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden wird eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse dieser Untersuchung gegeben:

1. In der Haut gesunder Probanden fand sich keine Expression von ILA-Rezeptor oder ICOS-Rezeptor in konventionellen Färbungen. Dies unterscheidet sie signifikant von der Haut des Psoriasis-erkrankten, sowohl von dessen beefallener als auch unbeefallener Haut. In der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten findet sich eine mäßige und in der beefallenen Haut eine deutliche Expression von ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor.
2. In der Auswertung der Dreifachmessungen, also an drei unabhängig voneinander gefärbten und gezählten Schnitten einer Biopsie, fanden sich signifikante Unterschiede innerhalb eines Triplets.
3. In der Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz fand sich eine Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der unbeefallenen und beefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von ILA-Rezeptor durch Mastzellen nach statistischer Auswertung. Nur als Trend zeigte sich, dass die relative Expression von ILA-Rezeptor durch Mastzellen in der Psoriasis-Plaques geringer ist als in der unbeefallenen Haut trotz zahlenmäßiger Zunahme der Mastzellen in der Psoriasis-Plaques. Aufgrund unterschiedlicher Schnittflächen kann die

Auswertung der absoluten Zellzahlen nicht herangezogen werden, doch als Trend war auch zu sehen, dass sich in der Psoriasisplaque insgesamt mehr ILA-Rezeptor-positive Mastzellen finden als in der unbefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten.

4. Die Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen war insgesamt gering. Zwischen unbefallener und befallener Haut des Psoriasis-erkrankten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.
5. Anhand der konventionellen Färbungen konnten wir zeigen, dass ILA- und ICOS-Ligand sowohl in der Haut gesunder Probanden als auch in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten exprimiert werden.
6. In Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich auf allen Mastzellen in der Haut gesunder Probanden und in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten eine Expression von ILA- und ICOS-Ligand.
7. In Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden und in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten eine Expression von ILA- und ICOS-Ligand ohne statistisch signifikante Unterschiede.
8. Auf Mastzellen fand sich auch in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten keine Expression von ICOS-Rezeptor.
9. In der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten fand sich insgesamt keine signifikante Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen und somit auch keine signifikanten Unterschiede.
10. Auf dendritischen Zellen fand sich in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten keine Expression von ICOS-Rezeptor.
11. Auf Makrophagen fand sich eine deutliche Expression von ICOS-Rezeptor in der Psoriasisplaque, geringer auch in der unbefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten.

Die folgende Tabelle 22 soll diese Ergebnisse zusammengefasst darstellen:

	konventionell			Try			CD2			p55			KiM1P		
	C	G	P	C	G	P	C	G	P	C	G	P	C	G	P
<b>ILA</b>	neg.	pos.	pos.	0%	78%	69%	0%	11%	7%	0%	?	?	0%	?	?
<b>ICOS</b>	neg.	pos.	pos.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	21%	37%
<b>ILAL</b>	pos.	pos.	pos.	100%	100%	100%	73%	52%	44%	?	?	?	?	?	?
<b>ICOSL</b>	pos.	pos.	pos.	100%	100%	100%	3%	14%	57%	?	?	?	?	?	?

**Tab. 22: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Expression von ILA- und ICOS-Rezeptor sowie von ihren Liganden.** In der linken Spalte sind die untersuchten Oberflächenmoleküle ILA-Rezeptor (ILA), ICOS-Rezeptor (ICOS), ILA-Ligand (ILAL) und ICOS-Ligand (ICOSL) aufgeführt. In der ersten Zeile ist die Art der Untersuchung angegeben: konventionelle immunhistochemische Färbung (konventionell), Doppelimmunfluoreszenz gegen Tryptase als Marker für Mastzellen (Try), gegen CD2 als Marker für T-Zellen (CD2), gegen p55 als Marker für dendritische Zellen (p55) und gegen KiM1P als Marker für Makrophagen (KiM1P). In der zweiten Zeile ist die untersuchte Gruppe aufgeführt, also die Haut gesunder Probanden (C), die unbeeinträchtigte Haut von Psoriasispatienten (G) und die Psoriasisplaque (P). In der Tabelle ist mit „neg.“ ausgedrückt, dass sich in der konventionellen Färbung keine Expression des Moleküls fand, mit „pos.“, dass sich eine Expression fand. Auf volle Prozentzahlen gerundet (Mittelwert der Auswertungen) ist die Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls durch den Zelltyp angegeben. Mit „?“ sind Untersuchungen gekennzeichnet, die noch nicht durchgeführt wurden.

## **IV. Diskussion**

### **IV. 1. Etablierung der Methode**

Ein Hauptbestandteil der Arbeit bestand in der Erprobung und Etablierung der Methode einschließlich Einbettungstechniken der Hautstanzen, Auswahl der Primärantikörper- und Sekundärantikörper, Etablierung der unterschiedlichen Methoden der Detektionssysteme in konventionellen immunhistochemischen Färbungen, Etablierung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen sowie der Abwendung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Zunächst haben wir die Einbettungsmethoden an Gefriermaterial und an Paraffinmaterial verglichen. Artefakte und eingeschränkte Detektionssensitivität können eine wichtige Einschränkung in der Immunhistochemie sein. Nachteile der Kryomethode waren destruierende Gefrierartefakte sowie Quetschartefakte insbesondere bei unseren Hautstanzen. Hauptnachteil der Paraffinmethode, die zwar qualitativ gute Schnitte bot, war die eingeschränkte Verwendbarkeit von Antikörpern. Zwar war es durch die unterschiedlichen Methoden der Demaskierung, z.B. durch Mikrowellenbehandlung oder enzymatische Vorbehandlung (Shi et al. 1997), sowie Verstärkungssysteme möglich, einen Teil der Antikörper zu etablieren, doch blieben bei einigen Primärantikörpern offene Probleme. Wir bemühten uns also, eine Einbettungsmethode zu finden, die die Vorzüge beider Methoden vereinte, zum einen qualitativ hochwertige Schnitte unserer Hautstanzen zu ermöglichen und zum anderen die Verwendung der von uns benötigten Primärantikörper in konventioneller Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenztechnik zu ermöglichen. Hier stellte sich die AMeX-Methode, welche durch Delsol et al. (1989) beschrieben wurde als günstig heraus.

Die AMeX-Methode bot gegenüber der Kryomethode den Vorteil, dass der Schnitt morphologisch gut erhalten blieb, und ermöglichte im Gegensatz zur klassischen Paraffineinbettung die Verwendung einer Vielzahl von Antikörpern. Sämtliche Methoden sowie die Anwendung der Primärantikörper und der Detektionssysteme für die konventionelle Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenz mussten in unserem Labor neu etabliert werden.

Für die konventionelle Immunhistochemie wurde ein in der Routinediagnostik gängiges biotinyliertes Ziege-anti-Maus/Kaninchen-Polymer (DAKO-Link) verwendet, und die Darstellung mittels Streptavidin HRP und AEC-Chromogen erzielt. Zum Teil war eine Tyramidverstärkung erforderlich. Das biotinylierte Phenol des „Tyramide Signal Amplification (TSA) Biotin Systems“ von Perkin Elmer bindet an HRP des Streptavidin HRP (Bobrow et al. 1992), so dass eine Verstärkung erreicht wird.

Zur Verbesserung der Detektionssensitivität wurde die Methode der Tyramidverstärkung entwickelt und 1989 als „catalyzed reporter deposition (CARD)“ publiziert (Bobrow et al. 1989, Bobrow et al. 1991). Die Methode wurde in unterschiedlichen Techniken, wie z.B. Immunessay (Bobrow et al. 1989, Bobrow et al. 1991), Western Blot (Bobrow et al. 1992) oder In-situ-Hybridisation (Kerstens et al. 1995, van Gilswijk et al. 1997) als auch Immunhistochemie (Adams 1992, Berghorn et al. 1994, van Gilswijk et al. 1997, Strappe et al. 1997, Toda et al. 1999) verwendet und zeigte eine Verbesserung der Sensitivität durch Tyramidverstärkung.

Diese Methode der Tyramidverstärkung wurde bereits durch zurückliegende Studien unter Verwendung zahlreicher Antikörper untersucht und mit klassischen Färbemethoden verglichen, wobei sich zeigte, dass mit der Methode der Tyramidverstärkung die meisten Primärantikörper 5- bis 50-fach gegenüber Standardfärbungen verdünnt werden konnten und sich gleiche Ergebnisse zeigten, ebenso waren kürzere Inkubationszeiten möglich. So kann ein verbesserter Hintergrund erreicht werden. Jedoch zeigte sich auch die Notwendigkeit, für jeden Primärantikörper ein individuelles Protokoll festzulegen (von Wasielewski et al. 1997).

Die Methode der Tyramidverstärkung war bereits von anderen erfolgreich in der Doppelimmunfluoreszenz angewendet worden. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz eines Tyramidverstärkungssystems bei Anwendung von zwei Primärantikörpern, die beide aus der gleichen Spezies stammten, grundsätzlich möglich war (Shindler und Roth 1996, Hunyady et al. 1996, Teramoto et al. 1998).

Vor eine neue Herausforderung stellte uns jedoch die Notwendigkeit, mit zwei Primärantikörpern aus der gleichen Spezies zu arbeiten, die beide eines

Verstärkungssysteme für die Doppelimmunfluoreszenz bedurften. Ein entsprechendes Verfahren, das mit zwei Tyramidverstärkungssystemen arbeitete, wurde bereits von Zaidi et al. (2000) beschrieben.

Die Etablierung dieses Verfahrens in unserem Labor erforderte eine gründliche Blockierung nicht nur des ersten Primärantikörpers, sondern auch des Tyramidverstärkungssystems aus diesem ersten Schritt der Färbung, sowie eine gründliche Kontrolle der Blockierungsschritte. Aufgrund der variablen Reaktivität des Tyramids, welche bereits durch von Wasielewski et al. (1997) beschrieben worden war, musste für jeden Primärantikörper in jeder notwendigen Kombination ein jeweils neues Protokoll mit Verdünnungen und Inkubationszeiten für Primär- und Sekundärantikörper sowie für Verstärkungssystem und Blockierungsschritte erarbeitet werden. Als Kontrolle dienten Schnitte ohne aufgetragenen ersten oder zweiten bzw. ersten und zweiten Primärantikörper. Blockierungsschritte erfolgten mit Fab-Fragmenten in TNB-Puffer sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung.

Um optimale Ergebnisse in der Doppelimmunfluoreszenz zu erreichen, war darüber hinaus die Auswahl der Fluorochrome und die Auswahl des Mikroskops entscheidend.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie stellte sich als ideal heraus, um eine sichere Zuordnung der zellulären Ko-Lokalisation von Signalen zu erreichen bei einer Auflösung von 0,18 µm in x-y-Dimension und 0,35 µm in z-Dimension des Leica TCS NT Laser-Scanning-Mikroskops. Diese Methode war zum Nachweis einer zellulären Ko-Lokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz bereits in der Vergangenheit angewandt worden (Soontornniyomkij et al. 1998 a, Soontornniyomkij et al. 1998 b). Auch lagen bereits Erfahrungen in der Doppelimmunfluoreszenz mit Tyramidverstärkung und Auswertung in konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie vor (Wang et al. 1999).

Bei der Auswahl der Fluorochrome entschieden wir uns für Indocarbocyanin (Cy3), welches als hellstes Fluorochrom erhältlich war und sich für Mehrfachfärbungen geeignet erwiesen hat (Wessendorf und Brelje 1992).

Das rot fluoreszierende Cy3 ist extrem leuchtintensiv und photostabil. Die relativ hydrophilen Cy3-konjugierten Nachweisreagenzien zeigen kaum unspezifische Bindung an Gewebe. Cy3 hat ein Exzitationsmaximum von 550 nm und ein Emissionsmaximum von 570 nm. Daher kann die Untersuchung Cy3-markierter Präparate ohne apparativen Mehraufwand mit einem konventionellen Rhodaminfilter am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Ebenso ist die Untersuchung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop möglich, da die Anregung mit einem Argonlaser bei 488 nm und 514 nm oder mit einem Krypton-Argon-Laser bei 532 nm erfolgen kann (Mujumdar et al. 1993). Die Intensität des Farbstoffs bleibt bei Aufbewahrung in geeigneten Materialien (dunkel, bei 4°C) jahrelang erhalten.

Indodicarbocyanin (Cy5) hat ein Exzitationsmaximum bei 650 nm und ein Emissionsmaximum bei 674 nm. Weil die Fluoreszenz von Cy5 für das menschliche Auge kaum sichtbar ist, können Cy5-Markierungen mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen nicht untersucht werden. Zur Untersuchung von Cy5-markierten Präparaten ist ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit Helium-Neon-Laser von 633 nm oder Krypton-Argon-Laser von 647 nm nötig. Ein besonderer Vorteil von Cy5 und seiner Anregung mit rotem Licht ist die resultierende niedrige Autofluoreszenz biologischer Proben. Für Mehrfachmarkierungen ist Cy5 besonders günstig, da sich sein Emissionspeak von den Emissionswellenlängen anderer gebräuchlicher Fluorochrome, auch Cy3, deutlich unterscheidet (Mujumdar et al. 1993, Cullander 1994).

Fluorochrome waren Antikörper-gebunden und Tyramid-gebunden erhältlich, so dass der Einsatz mit und ohne Verstärkungssystem möglich war. Fluorochrom-markierte Tyramide waren bereits in der Vergangenheit durch andere Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt worden (van Gijlswijk et al. 1997).

Die Auswertung unserer Doppelimmunfluoreszenzfärbungen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Diese Technik ermöglichte die Untersuchung zweier Fluoreszenzen in einer Ebene und damit die Zuordnung zu einer Zelle, sowie die Verwendung von Cy3- und Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern, die eine Minimierung der Überlagerung der Emissionsspektren und damit falsch-positiver Ergebnisse ermöglichte.

## **IV. 2. Statistische Problematik**

Die Verlässlichkeit der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen sowie der Auszählungsmethode wurde in Dreifachmessungen untersucht. Dazu wurden jeweils 3 Schnitte pro Hautbiopsie angefertigt und ausgewertet. Diese Daten wurden statistisch ausgewertet, wie es Abbildung 7 und Tabelle 10 zu entnehmen ist. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dreifachmessungen einer Gruppe (p-Wert 0,0417). Auch zeigte sich keine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Wiederholung (p-Wert 0,1675), d.h. die Verläufe der Wiederholungen waren in beiden Gruppen nicht parallel.

Die statistische Signifikanz ist bekanntermaßen vom Stichprobenumfang abhängig. Mit 5 Probanden, ist die Anzahl der untersuchten Individuen in unseren Untersuchungen wahrscheinlich zu gering angesetzt, um eine statistische Signifikanz zu erreichen. Doch geben die vorliegenden Untersuchungen Hinweis auf einen Trend, den wir mit Untersuchungen in Doppelimmunfluoreszenztechnik aufzeigen konnten, wie in den folgenden Kapiteln dargestellt werden wird.

Untersuchungen in konventionell immunhistochemischer Technik, die klar aufzeigen konnten, dass in der Haut gesunder Probanden im Gegensatz zu der Haut von Psoriasispatienten keine Expression von ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor vorliegt, sind als eindeutige Befunde zu werten.

## **IV. 3. Bedeutung der kostimulatorischen Mediatorsysteme ILA und ICOS auf Mastzellen und T-Zellen**

Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung der Frage beitragen, wie sich die Expression der kostimulatorischen Moleküle ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor sowie ihrer Liganden in der Psoriasis vulgaris, als Beispiel einer TH1-/TH17-Zell-vermittelten Reaktion, verhält, und ob diese Moleküle bei der Initiierung und Unterhaltung der Immunantwort spielen könnten.

Die Pathophysiologie der Psoriasis und die Bedeutung der T-Zelle, der Mastzelle, der dendritischen Zelle und des Makrophagen wurden bereits in der Einleitung erörtert.

Ebenso wurde die Bedeutung der untersuchten kostimulatorischen Moleküle ILA- und ICOS-Rezeptor sowie ihrer Liganden auf den beschriebenen Zellen und ihre Bedeutung in der Entzündungsreaktion dargestellt.

Über den Zusammenhang von ILA-Rezeptor und seines Liganden mit der Psoriasis gab es in der Vergangenheit keine Erkenntnisse. Da jedoch bekannt war, dass ILA-Rezeptor zu der Gruppe der T-Zell-kostimulierenden Moleküle gehört, war dies Anlass für die vorliegenden Untersuchungen.

In der Einleitung war ich auch bereits auf die Erkenntnisse zum ILA-System in der Literatur eingegangen. Es kann zusammengefasst werden, dass ILA-Rezeptor ein T-Zell-kostimulatorisches Molekül und Mitglied der TNF-Rezeptoren-Familie ist und auf aktivierten CD4- und CD8-T-Zellen sowie NK-Zellen und Monozyten exprimiert wird (Schwarz et al. 1993, Schwarz et al. 1995, Wang et al. 1998, Kienzle und von Kempis 2000). Auch konnte eine Expression von ILA-Rezeptor auf FDC nachgewiesen werden (Pauly et al. 2002, Lindstedt et al. 2003). ILA-Rezeptor bindet an seinen Liganden, der auf B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Dendriten gefunden wurde (Wilcox et al. 2002). Durch eine Aktivierung von ILA-Rezeptor auf T-Zellen wird die Proliferation von T-Zellen begünstigt, besonders von CD8-T-Zellen, welche im Verlauf der psoriatischen Entzündung in der Epidermis dominieren. Weiterhin werden durch die Aktivierung des ILA-Rezeptors auf T-Zellen Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-2 ausgeschüttet, was wiederum eine TH1-Antwort begünstigt (Shuford et al. 1997, Kim et al. 1998, DeBenedette et al. 1995, Bukczynski et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass ILA-Rezeptor in der Regulation der zytotoxischen T-Zell-Immunantwort eine zentrale Rolle spielt.

Zur Rolle des ILA-Systems in der TH17-vermittelten Reaktion und Expression durch TH17-Zellen liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Auch das ICOS-System habe ich bereits in der Einleitung dargestellt. Es kann zusammengefasst werden, dass ICOS-Rezeptor ebenfalls ein kostimulatorisches Molekül und ein Mitglied der CD28-Rezeptor-Familie ist. Sein Partner ist ICOS-Ligand.

ICOS-Rezeptor wird nach Aktivierung von CD4-T-Zellen auf ihnen exprimiert, ebenso auf aktivierten CD8-T-Zellen, nicht hingegen auf aktivierten B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen oder Thrombozyten (Yoshinaga et al. 1999, Coyle et al. 2000, Hutloff et al. 1999).

ICOS-Ligand wird auf B-Zellen und dendritischen Zellen stark exprimiert, ebenso auf Endothelzellen und auf Keratinozyten, weniger auf T-Zellen und Monozyten und Makrophagen (Greenwald et al 2005, Kroczeck et al. 2004, Khayyamian et al. 2002), wie auch die vorliegende Arbeit zeigt.

Eine zentrale Rolle des ICOS-Rezeptors in der TH2-Antwort konnte in mehreren Arbeiten (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2000, Dong et al. 2001) gezeigt werden. So wurde bei ICOS-knock-out-Mäusen gezeigt, dass ICOS-Rezeptor für die Produktion von IL-4 von essentieller Bedeutung ist. ICOS-Rezeptor-Aktivierung fördert die T-Zell-Proliferation, die Sekretion der TH2-Zytokine IL-4 und IL-5 sowie von IL-10, IFN- $\gamma$ , und TNF- $\alpha$  sowie die Hochregulation von Oberflächenmolekülen.

Neuere Untersuchungen belegen jedoch auch eine wichtige Rolle des ICOS-Systems in der TH1-Antwort, zum Beispiel bei der akuten und chronischen Transplantatabstoßung (Sperling und Bluestone 2001, Smith et al. 2003, Ozkaynak et al. 2001, Khayyamian et al. 2002).

Es konnte auch schon gezeigt werden, dass ICOS-Rezeptor die TH17-Zell-Antwort reguliert (Park et al. 2005, Schaefer et al. 2010).

Kürzlich konnte eine mögliche Beteiligung des ICOS-Systems in der T-Zell-Kostimulation in der Pustulosis palmaris et plantaris, einer Variante der Psoriasis, in vivo gezeigt werden (Sakiyama et al. 2008).

Die beschriebenen Befunde wurden bisher hauptsächlich im Mausmodell und in vitro erhoben. Ziel unserer Untersuchungen war es, das Vorkommen der Systeme ILA und ICOS im Rahmen der Psoriasis vulgaris zu untersuchen und damit die Relevanz der Systeme ILA und ICOS im Rahmen einer TH1- und TH17-vermittelten Erkrankung zu ermitteln.

Als Marker für Mastzellen verwendeten wir in unseren Untersuchungen Tryptase, als Marker für T-Zellen CD2. Bei CD2 handelt es sich um einen Pan-T-Zell-Marker, der neben T-Zellen auch NK-Zellen detektiert. Eine Infiltration mit NK-Zellen in der Psoriasis ist seit längerem bekannt (Cameron et al. 2002). Zu differenzieren sind NK-Zellen und NK-T-Zellen. NK-Zellen sind beim Menschen als CD3-negative und CD56-positive Lymphozyten definiert (von Bubnoff et al. 2010). NK-T-Zellen (CD3+CD56+) sind eine Subspezies von Lymphozyten, die den T-Zell-Rezeptor und NK-Zell-Rezeptoren wie CD94 und CD161 exprimieren (von Bubnoff et al. 2010). In läsionaler Psoriasis-Haut sind ca. 5 bis 8% der NK-Zellen (CD3-CD56+) in der mittleren und papillären Dermis lokalisiert (Ottaviani et al. 2006). Diese NK-Zellen produzieren große Mengen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Bisher ist die Bedeutung der NK-Zelle und NK-T-Zelle in der Psoriasis wenig erforscht. Da in der vorliegenden Arbeit ein CD2-Antikörper verwendet wurde, sind neben den T-Zellen, welche die Psoriasis-Haut hauptsächlich infiltrieren, möglicherweise auch ein kleinerer Anteil NK-Zellen erfasst worden.

#### **IV. 4. Dysregulation des Negativ-Rückkopplungs-/Feedback-Mechanismus des ILA- und ICOS-Systems**

In unseren konventionellen immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass sich in der gesunden Haut keinerlei Expression von ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor fand. Jedoch die Psoriasis-erkrankten zeigten nicht nur in ihrer befallenen, sondern auch in ihrer unbefallenen Haut, eine Expression sowohl des ILA-Rezeptors als auch des ICOS-Rezeptors. Dieses Ergebnis war signifikant.

Demgegenüber fanden wir für sowohl den ILA- Liganden als auch den ICOS-Liganden keine signifikante Veränderung in ihrer Expression, sondern vielmehr eine konstitutionelle Expression beider Liganden.

In zahlreichen immunmodulatorischen Systemen wird ein Negativ-Rückkopplungs- oder auch Negativ-Feedback-Mechanismus angenommen, der die T-Zell-Funktionen reguliert. Dieser Mechanismus spielt wahrscheinlich in zahlreichen Immunantworten eine Rolle (Yellin et al. 1994).

Es ist bekannt, dass die Expression von ICOS-Rezeptor und ICOS-Ligand in Entzündungsreaktionen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen eine Rolle in der Entwicklung oder Progression der Erkrankungen spielt (Shilling et al. 2006, Sato et al. 2004). ICOS-Rezeptor und ICOS-Ligand sind in diesen Entzündungsreaktionen vermehrt exprimiert. An einer ICOS-transgenen Maus mit hoher konstitutiver Expression von ICOS-Rezeptor auf T-Zellen untersuchte Watanabe et al. (2008) den Effekt einer vermehrten Expression von ICOS-Rezeptor auf das Immunsystem. Die Expression von ICOS-Ligand auf antigenpräsentierenden Zellen war signifikant erniedrigt. Es konnte gezeigt werden, dass der ICOS-Ligand durch eine Interaktion mit dem ICOS-Rezeptor herunterreguliert wird. Die verminderte Expression von ICOS-Ligand war abhängig von einer Zell-Zell-Kommunikation mit T-Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines Negativ-Rückkopplungs-Mechanismus im ICOS-System während der Immunantwort. Auch Hutloff et al. (2004) zeigte eine Verringerung der Expression von ICOS-Ligand auf B-Zellen nach Interaktion mit T-Zellen über das ICOS-System.

Diese Erkenntnisse lassen sich auf unsere Beobachtung anwenden, dass sich bereits in der phänomenologisch unauffälligen, unbefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten eine vermehrte Expression des ICOS-Rezeptors findet. Dies unterscheidet die unbefallene Haut des Psoriasis-erkrankten signifikant von der Haut gesunder Probanden. Dass in unseren Untersuchungen sowohl der ICOS-Rezeptor als auch der ICOS-Ligand, welcher offensichtlich konstitutionell exprimiert wird, hochreguliert sind, kann als ein Hinweis auf einen gestörten Negativ-Rückkopplungs-Mechanismus des ICOS-Systems in der Psoriasis, einem Beispiel einer Autoimmunerkrankung, gewertet werden.

Für den ILA-Rezeptor und seinen Liganden konnten wir denselben Befund erheben. Eine Störung des Negativ-Rückkopplungs-Mechanismus kann daher auch für dieses kostimulatorische Molekülsystem bei der Psoriasis diskutiert werden.

#### **IV. 5. Bedeutung der Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen und T-Zellen**

In der Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnten wir eine etwa gleich starke Expression von ILA-Rezeptor auf Mastzellen in der unbeeinflussten und beeinflussten Haut des Psoriasis-erkrankten nachweisen. Die Expression von ILA-Rezeptor auf T-Zellen war erstaunlicherweise vergleichsweise gering, auch hier zeigte sich zwischen unbeeinflusster und beeinflusster Haut des Psoriasis-erkrankten kein signifikanter Unterschied.

Bereits in der Einleitung habe ich die Bedeutung der Mastzelle und der T-Zelle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und insbesondere der Psoriasis dargestellt.

Auf Mausmastzellen konnte bereits eine Expression von ILA-Rezeptor nachgewiesen werden (Nishimoto et al. 2005). Wir konnten in unseren Untersuchungen nun auch eine Expression von ILA-Rezeptor durch humane Mastzellen in der Psoriasis zeigen. Unsere Ergebnisse erhärten die Annahme, dass der Mastzelle in der Pathogenese der Psoriasis eine zentrale Rolle zukommt. Wir konnten zeigen, dass Mastzellen sowohl in läsionaler wie auch in nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten vermehrt ILA-Rezeptor und auch, jedoch nicht vermehrt, ILA-Ligand exprimieren. Dies lässt vermuten, dass Mastzellen als immunkompetente Zellen (Metcalf et al. 1997, Moon et al. 2010) an der Zell-Zell-Kommunikation beispielsweise mit T-Zellen oder auch Makrophagen beteiligt sind und so an der Initiierung und Unterhaltung der Psoriasis beteiligt sind. Die Interaktion von Mastzellen mit T-Zellen konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Harvima et al. 2008, Mekori und Metcalfe 1999, Sayed und Brown 2007). Es ist bekannt, dass Mastzellen Mitglieder der TNF-Rezeptoren-Familie exprimieren, z.B. OX40-Ligand der CD30-Ligand, und mit T-Zellen interagieren. Weitere Untersuchungen, u.a. zur Sekretion von Psoriasis-relevanten Chemokinen und Zytokinen durch die über das ILA-System aktivierte Mastzelle scheinen erforderlich.

#### **IV. 6. Bedeutung der kostimulatorischen Mediatorsysteme ILA und ICOS in nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten**

Unsere Ergebnisse der konventionellen Färbungen hatten gezeigt, dass sich in der Haut gesunder Probanden keine Expression von ILA-Rezeptor oder ICOS-Rezeptor fand. Dies unterscheidet die Haut gesunder Probanden signifikant von der Haut des Psoriasis-erkrankten, sowohl von dessen befallener als auch unbeefallener Haut.

Es ist bekannt, dass Mastzellen immunologisch und auch mechanisch aktiviert werden können (Kneilling und Röcken 2009). In nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten wurde experimentell ein Köbner-Phänomen ausgelöst. Es wurde eine Vermehrung von Mastzellen am 4. Tag nach Stimulus und ein Maximum am 14. Tag nach Stimulus mit dem Erscheinen des Köbner-Phänomens beobachtet (Toruniowa und Jablonska 1988). Dies legt die Bedeutung der Mastzelle und ihrer Mediatoren in der Entstehung der Psoriasis nahe.

Die Tatsache, dass wir den Nachweis erbringen konnten, dass Mastzellen auch in nicht-läsionaler Haut von Psoriasis-erkrankten ILA-Rezeptor exprimieren, lässt vermuten, dass die Mastzellen in der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten voraktiviert sind. Ähnliches lässt sich für T-Zellen vermuten, die ebenfalls in der unbeefallenen und befallenen Haut ILA-Rezeptor exprimierten, oder für Makrophagen, die in unbeefallener und befallener Haut ICOS-Rezeptor exprimierten. Diese Befunde könnten eine Erklärung für das bekannte Köbner-Phänomen bei der Psoriasis liefern, denn die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle dürfte mit einer gesteigerten Bereitschaft der Zellen einhergehen, auf proinflammatorische Reize mit einer chronischen Entzündung zu reagieren.

#### **IV. 7. T-Zellen in der Psoriasis sind ICOS-Rezeptor-negativ**

In der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten fand sich eine mäßige und in der befallenen Haut eine deutliche Expression von ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor. Im Gegensatz zum ILA-Rezeptor wurde der ICOS-Rezeptor aber nicht von den Mastzellen exprimiert. Überraschend war, dass sich auch auf T-Zellen in der unbeefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten keine signifikante

Expression von ICOS-Rezeptor fand. Auf Mastzellen und T-Zellen fanden wir in unseren Doppelimmunfluoreszenzfärbungen lediglich den ICOS-Liganden signifikant exprimiert.

Seit längerem ist nämlich bekannt, dass ICOS-Rezeptor auf T-Zellen exprimiert wird und zahlreiche Immunerkrankungen vermittelt (Beier et al. 2004, Zheng et al. 2005, Scott et al. 2004, Ding et al. 2006). Bekannt ist auch, dass ICOS-Rezeptor von wichtiger Rolle in der Regulation der TH2-Antwort ist (Dong et al. 2001, McAdam et al. 2001). Gleichwohl spielt das ICOS-System aber auch, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in der TH1-Antwort eine wichtige Rolle, wie beispielsweise auch in der akuten und chronischen Transplantatabstoßung gezeigt werden konnte (Sperling und Bluestone 2001, Smith et al. 2003, Ozkaynak et al. 2001, Khayyamian et al. 2002). Kürzlich konnte auch eine Beteiligung von ICOS-Rezeptor in der T-Zell-Kostimulation in der Pustolosis palmaris et plantaris, die möglicherweise eine Sondervariante der Psoriasis darstellt, in vivo gezeigt werden (Sakiyama et al. 2008). Hinweise auf eine Rolle des ICOS-Systems in der Regulation der TH17-vermittelten Immunantwort (vgl. Park et al. 2005, Schaefer et al. 2010) gibt es seit jüngerer Zeit ebenfalls, worauf ich auch in der Einleitung bereits eingegangen bin.

Insofern passen unsere Ergebnisse einer vermehrten Expression von ICOS-Rezeptor durch Entzündungszellen in der Psoriasis, als einer TH1- und TH17-Zell-vermittelten Erkrankung grundsätzlich zu der zitierten Literatur. Überraschend hingegen war die Entdeckung, dass es aber nicht die Mastzellen oder T-Zellen waren, die den ICOS-Rezeptor exprimierten, sondern Makrophagen. Beide Zelltypen exprimierten jedoch den ICOS-Liganden in allen untersuchten Stadien der Erkrankung und bei gesunden Probanden in gleichem Maße. Unsere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass das ICOS-System in der Psoriasis zwar eine zentrale Rolle spielt, nicht jedoch während der von uns untersuchten pathogenetischen Phase auf T-Zellen oder Mastzellen. In der Psoriasis scheint eine andere immunkompetente Zelle über das ICOS-System zu interagieren.

Dass das ICOS-System in anderen, insbesondere primär TH2-Zell-vermittelten Erkrankungen (wie beispielsweise der Atopischen Dermatitis), auch auf T-Zellen eine zentrale Rolle spielt, ist aufgrund der Literatur zu vermuten. Dies wäre sicherlich ein

Forschungsthema von Interesse und könnte methodisch mittels Doppelimmunfluoreszenztechnik beantwortet werden. Für eine zentrale Rolle des ICOS-Systems in der TH2-Immunantwort gibt es zahlreiche Hinweise, wie bereits in der Einleitung dargestellt.

In der Psoriasis spielt das IFN- $\gamma$  eine zentrale Rolle. In der Psoriasis überwiegen TH1-Zellen, welche IFN- $\gamma$  sezernieren, gegenüber TH2-Zellen (Wilsmann-Theis et al. 2008). Löhning et al. (2003) haben zeigen können, dass T-Zellen mit geringer ICOS-Rezeptor-Expression IFN- $\gamma$  produzieren, T-Zellen mit mittlerer ICOS-Rezeptor-Expression produzieren IL-4 und IL-5 und mit hoher ICOS-Rezeptor-Expression produzieren IL-10. Unsere Entdeckung der ICOS-Rezeptor-negativen T-Zelle in der Psoriasis würde somit für IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellen in den untersuchten Hautläsionen sprechen und somit die oben genannte Entdeckung durch ein in-vivo-Modell unterstützen.

#### **IV. 8. Identifizierung der ICOS-Rezeptor-positiven Zelle in der Psoriasis**

Unsere konventionellen Färbungen zeigten, dass sich in der Haut gesunder Probanden keine Expression von ICOS-Rezeptor fand, sich jedoch die unbefallene Haut von Psoriasis-erkrankten durch eine mäßige ICOS-Rezeptor-Expression und befallene Haut von Psoriasis-erkrankten durch eine deutliche Expression des ICOS-Rezeptors signifikant unterschied. Es sind aber nicht die Mastzellen oder T-Zellen in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten, die den ICOS-Rezeptor in Doppelimmunfluoreszenzfärbungen exprimieren.

Zunehmend ist die pathogenetische Bedeutung von dendritischen Zellen und Makrophagen in der Psoriasis. Zahlreiche Arbeiten (Camp 1998, Schön und Boehncke 2005, Nestle et al. 2009) zeigten, dass es sich bei der Psoriasis um einen inflammatorischen Hautgewebsprozess handelt und sich eine Infiltration von T-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen sowie Vermehrung von Mastzellen zeigt. Dies habe ich bereits in der Einleitung dargestellt.

Der Frage, welche Zellen den ICOS-Rezeptor in der Psoriasis exprimieren, gingen wir noch weiter nach, indem wir die Koexpression von ICOS-Rezeptor und p55,

einem Pan-Dendriten-Marker, untersuchten.

Der monoklonale Antikörper p55 detektiert Fascin, ein Aktin-bindendes Protein von 55 kDa, welches 1985 erstmals beschrieben wurde (Yamashiro-Matsumura und Matsumura 1985, Yamashiro-Matsumura und Matsumura 1986). Der Antikörper p55 ist zur Detektion von dendritischen Zellen in Blut und Gewebe geeignet, wie zahlreiche Studien zeigten (Bobryshev und Lord 1999, Jaffe et al. 1998). Fascin wird exprimiert von im Blut zirkulierenden dendritischen Zellen sowie von interdigitierenden dendritischen Zellen im Lymphknoten, es ist diffus im Zytoplasma lokalisiert und ist auch in den dendritischen Fortsätzen zu finden, es ist mit Aktin kolokalisiert. Monozyten, Granulozyten, T- und B-Zellen sind negativ für p55 (Mosialos et al. 1996). Fascin hat sich als zuverlässiger Marker für dendritische Zellen in nicht neoplastischem Lymphgewebe herausgestellt (Pinkus et al. 1997) und war auch in zahlreichen anderen Geweben verwendet worden. Auch in der Dermis fanden sich Fascin-positive dendritische Zellen (Jaffe et al. 1998, Brunhuber et al. 2008). Fascin ist jedoch nicht spezifisch für dendritische Zellen, falsch-positive Befunde sind für weitere Zellen zu erwarten, die ebenfalls Fascin exprimieren, wie z.B. epitheliale und neuronale Zellen, Gliazellen, Endothelzellen und den Sinus auskleidende Zellen der Milz. Außerdem konnte eine Expression von Fascin durch Epstein-Barr-Virus (EBV) in bestimmten B-Zellen induziert werden (Mosialos et al. 1994).

Falsch-negative Befunde bezüglich dendritischer Zellen sind zu erwarten bei Langerhans-Zellen, da Fascin in Langerhans-Zellen unterschiedlich, vom Grade der Reifung abhängig, exprimiert wird (Ross et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fascin vom Grad der Reifung der dendritischen Zelle zur antigenrepräsentierenden Zelle abhängig ist (Al-Alwan et al. 2001).

Auf dendritischen Zellen, die wir über den pan-Dendrit-Marker p55/ Fascin dargestellt haben, fanden wir in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten keine Expression von ICOS-Rezeptor.

Jedoch fanden wir auf Makrophagen, die wir mit dem Marker KiM1P dargestellt haben, eine deutliche Expression von ICOS-Rezeptor in der Psoriasis-Plaques, geringer auch in der unbefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten.

Die Bedeutung von Makrophagen in der Psoriasis, welche bereits in der Einleitung

dargestellt wurde, kann soweit zusammengefasst werden, dass neben T-Zellen auch Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten in der Effektorphase in die Haut einwandern. T-Zellen werden durch Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert. IFN- $\gamma$ , das in der Pathogenese der Psoriasis in der Effektorphase von zentraler Rolle, kann die Immigration von Immunzellen in die Haut fördern und Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren. MIG (Interferon- $\gamma$ -induziertes Monokin) wird von Makrophagen exprimiert und lockt T-Zellen an, es wird selbst durch IFN- $\gamma$  induziert, welches selbst von T-Zellen gebildet wird, so dass dieser Mechanismus entzündungsverstärkend wirkt (Schön und Boehncke 2005).

Sakiyama et al. (2008) konnten in vivo zeigen, dass ICOS-Rezeptor in der T-Zell-Kostimulation in der Pustolosis palmaris et plantaris möglicherweise beteiligt ist. Dass ICOS-Rezeptor in der Modulation nicht nur der TH2-, sondern auch der TH1- und TH17-Immunantwort eine zentrale Rolle einnimmt konnten mehrere Untersuchungen zeigen, die in der Einleitung dargestellt wurden. Über die konkrete Funktion des ICOS-Systems in der Psoriasis ist bisher wenig bekannt. Es ist weiter zu erforschen, ob Makrophagen mit beispielsweise T-Zellen, welche auch den ICOS-Liganden tragen, kommunizieren und ob beispielsweise die MIG-Produktion hiervon abhängig ist. Ebenso wäre von Interesse, ob Makrophagen auch den ILA-Rezeptor exprimieren.

#### **IV. 9. Bedeutung des ILA- und ICOS-Liganden in der Psoriasis**

Ebenso wurde die Expression von ILA-Ligand und ICOS-Ligand untersucht. Es fand sich in der konventionellen Immunhistochemie eine breite Expression sowohl in der Haut gesunder Probanden als auch in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten. In Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich auf allen Mastzellen in der Haut gesunder Probanden und in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten eine Expression von ILA- und ICOS-Ligand, auf T-Zellen in der Haut gesunder Probanden und in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasis-erkrankten fand sich eine Expression von ILA- und ICOS-Ligand ohne statistisch signifikante Unterschiede.

ILA-Ligand wird bekanntermaßen von B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Dendriten exprimiert (Wilcox et al. 2002). Kashiwakura et al. (2004) konnten eine Expression von ILA-Ligand auch durch humane Mastzellen zeigen. ICOS-Ligand wird auf B-Zellen und dendritischen Zellen stark exprimiert, weniger auf T-Zellen und Monozyten und Makrophagen, ebenso auf Endothelzellen und Keratinozyten (Greenwald et al. 2005, Kroczek et al. 2004, Khayyamian et al. 2002). Nakae et al. (2006) konnten eine Expression von ICOS-Ligand durch Knochenmark-gewonnene kultivierte Mausmastzellen („mouse bone marrow-derived cultured mast cells“, BMCMCs) nachweisen. In unseren Untersuchungen gelang uns nunmehr der Nachweis einer ICOS-Ligand-Expression durch humane Mastzellen in der Psoriasis und beim Gesunden in der Haut in vivo. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass Mastzellen in der Induktion und Unterhaltung von Autoimmunerkrankungen, hier am Beispiel der Psoriasis, durch eine Zell-Zell-Kommunikation über die kostimulatorischen Systeme von ILA und ICOS beteiligt sind. Von Interesse zukünftiger Untersuchungen dürfte beispielsweise die Expression dieser Systeme in TH2-Zell-vermittelten Erkrankungen wie der Atopischen Dermatitis sein.

## **V. Zusammenfassung**

Erstmalig wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der kostimulatorischen Moleküle ILA-Rezeptor (ILA, „induced by lymphocyte activation“, CD137 in der humanen bzw. 4-1BB in der murinen Klassifikation) aus der TNF-Rezeptoren-Familie und ICOS-Rezeptor (ICOS, „inducible costimulator“, CD278) aus der CD28-Rezeptor-Familie bei der Hautkrankheit Psoriasis vulgaris in vivo belegt.

Wir konnten auch zeigen, dass in der Haut gesunder Probanden keine Expression des ILA-Rezeptors und des ICOS-Rezeptors vorliegt. Interessanterweise zeigt bereits die unbeefallene Haut des Psoriasis-erkrankten eine Expression von ILA-Rezeptor und ICOS-Rezeptor. Dies könnte als Hinweis auf eine Dysregulation des Negativ-Rückkopplungs/Feedback-Mechanismus dieser kostimulatorischen Systeme bei gleichzeitiger konstitutioneller Expression der Liganden gewertet werden.

Es konnte eine signifikante Hochregulation des ILA-Rezeptors auf Mastzellen in der unbeefallenen und beefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten gegenüber der gesunden Haut von Probanden gezeigt werden und damit auch erstmals die Expression von ILA-Rezeptor durch humane Mastzellen in vivo. Damit konnte auch die Mastzelle als diejenige Zelle in der Psoriasis identifiziert werden, welche den ILA-Rezeptor vorwiegend exprimiert.

Überraschend war, dass bereits in der unbeefallenen, phänomenologisch unauffälligen Haut des Psoriasis-erkrankten die ILA-Rezeptor-Expression auf Mastzellen signifikant erhöht war. Das Zellaktivierungspotential stark ILA-Rezeptor-positiver Mastzellen in unbeefallener Psoriasis-Haut dürfte ein wesentlicher Faktor für die Exzitabilität der unbeefallenen Haut des Psoriasis-erkrankten sein und damit eine mögliche Erklärung für das Köbner-Phänomen in der Psoriasis liefern. Ebenso konnte auf den T-Zellen in der Psoriasis-Haut die Expression von ILA-Rezeptor gezeigt werden, jedoch war kein signifikanter Unterschied der ILA-Rezeptor-Expression auf T-Zellen in unbeefallener und beefallener Haut von Psoriasis-erkrankten zu beobachten. Die Daten legen eine zentrale Rolle der Mastzelle in der Zell-Zell-Interaktion bei der Initiierung der Psoriasisläsion auf Ebene des ILA-Rezeptors nahe.

Für ICOS-Rezeptor konnte auf Mastzellen und T-Zellen keine signifikante Expression in der Psoriasishaut gezeigt werden, ebenso nicht auf dendritischen Zellen. Demgegenüber ließ sich aber eine vermehrte ICOS-Rezeptor-Expression auf Makrophagen nachweisen.

Für den ILA- und ICOS-Liganden zeigte sich in allen untersuchten Geweben, also sowohl bei gesunden Probanden wie auch in der unbefallenen und befallenen Haut des Psoriasiserkrankten, eine gleich starke, konstitutionelle Expression. Einer Aktivierung dieser Ligandensysteme dürfte in der Immunpathogenese der Psoriasis daher keine Bedeutung zukommen im Gegensatz zum ILA- und ICOS-Rezeptor.

## VI. Literaturverzeichnis

- Ackermann L, Harvima IT (1998): Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF-alpha and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis. Arch Dermatol Res 290(7), 353-359
- Ackermann L, Harvima IT, Pelkonen J, Ritamäki-Salo V, Naukkarinen A, Harvima RJ, Horsmanheimo M (1999): Mast cells in psoriatic skin are strongly positive for interferon-gamma. Br J Dermatol 140(4), 624-633
- Adams JC (1992): Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. J Histochem Cytochem 40(10), 1457-1463
- Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TD, West KA (2001): Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells. J Immunol 166(1), 338-345
- Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk HD, Docke WD (1998): IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. J Clin Invest 101(4), 783-794
- Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG (1999): The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. J Invest Dermatol 113(5), 752-759
- Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Büchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA (2000): Induction, binding specificity and function of human ICOS. Eur J Immunol 30(12), 3707-3717
- Beier KC, Hutloff A, Löhning M, Kallinich T, Kroczeck RA, Hamelmann E (2004): Inducible costimulator-positive T cells are required for allergen-induced local B-cell infiltration and antigen-specific IgE production in lung tissue. J Allergy Clin Immunol 114(4), 775-782
- Bender R, Lange S (2001 a): Was ist der p-Wert? Dtsch Med Wochenschr 126, 39-40

- Bender R, Lange S (2001 b): Was ist ein Konfidenzintervall? Dtsch Med Wochenschr 126, 41
- Bengtsson A, Scheynius A, Avila-Cariño J (2000): Crosslinking of CD30 on activated human Th clones enhances their cytokine production and downregulates the CD30 expression. Scand J Immunol 52(6), 595-601
- Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE (1994): cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. J Histochem Cytochem 42(12), 1635-1642
- Bhattacharyya SP, Drucker I, Reshef T, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, Mekori YA (1998): Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. J Leukoc Biol 63(3), 337-341
- Bigler CF, Norris DA, Weston WL, Arend WP (1992): Interleukin-1 receptor antagonist production by human keratinocytes. J Invest Dermatol 98(1), 38-44
- Bischoff SC, Krämer S (2007): Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. Immunol Rev 217, 329-37
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Methods 125(1-2), 279-85
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1991): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. J Immunol Methods 137(1), 103-112
- Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J (1992): The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. J Immunol Methods 150(1-2), 145-149
- Bobryshev YV, Lord RS (1999): 55-kD actin-bundling protein (p55) is a specific marker for identifying vascular dendritic cells. J Histochem Cytochem 47(11), 1481-1486

- Bonifati C, Carducci M, Cordiali Fei P, Trento E, Sacerdoti G, Fazio M, Ameglio F (1994): Correlated increases of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and granulocyte monocyte-colony stimulating factor levels in suction blister fluids and sera of psoriatic patients - relationships with disease severity. *Clin Exp Dermatol* 19(5), 383-387
- Bos JD, De Rie MA (1999): The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20(1), 40-46
- Brunhuber T, Haybaeck J, Schäfer G, Mikuz G, Langhoff E, Saeland S, Lebecque S, Romani N, Obrist P (2008): Immunohistochemical tracking of an immune response in mammary Paget's disease. *Cancer Lett* 272(2), 206-220
- Bukczynski J, Wen T, Watts TH (2003): Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol* 33(2), 446-454
- Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CE (2002): Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 294(8), 363-369
- Camp RDR: Psoriasis; in: *Textbook of Dermatology*; hrsg. v. Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM; Blackwell Science Ltd., Oxford 1998, 1589-1649
- Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB, Gorman DM, Smith K, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, McClanahan TK, Bowman EP (2006): IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 203(12), 2577-2587
- Christophers E (2001): Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26(4), 314-320
- Christophers E, Mrowietz U: Psoriasis; in: *Dermatologie und Venerologie*; hrsg. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M; Springer Verlag, Heidelberg 2005, 476-497

- Clay BS, Shilling RA, Bandukwala HS, Moore TV, Cannon JL, Welcher AA, Weinstock JV, Sperling AI (2009): Inducible costimulator expression regulates the magnitude of Th2-mediated airway inflammation by regulating the number of Th2 cells. *PLoS One* 4(11), e7525
- Cooper D, Bansal-Pakala P, Croft M (2002): 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 32(2), 521-529
- Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC (2000): The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13(1), 95-105
- Cullander C (1994): Imaging in the far-red with electronic light microscopy: requirements and limitations. *J Microsc* 176(3), 281-286
- DeBenedette MA, Chu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS, Watts TH (1995): Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *J Exp Med* 181(3), 985-992
- DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH (1997): Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158(2), 551-559
- DeBenedette MA, Wen T, Bachmann MF, Ohashi PS, Barber BH, Stocking KL, Peschon JJ, Watts TH (1999): Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 163(9), 4833-4841
- Delsol G, Chittal S, Brousset P, Caveriviere P, Roda D, Mazerolles C, Barillet-Alard C, al Saati T, Gorguet B, Voigt JJ (1989): Immunohistochemical demonstration of leucocyte differentiation antigens on paraffin sections using a modified AMeX (ModAMeX) method. *Histopathology* 15(5), 461-471

- Ding H, Wu X, Wu J, Yagita H, He Y, Zhang J, Ren J, Gao W (2006): Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol* 118(2-3), 258-267
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA (2001): ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409(6816), 97-101
- Drenkard D, Becke FM, Langstein J, Spruss T, Kunz-Schughart LA, Tan TE, Lim YC, Schwarz H (2007): CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. *FASEB J* 21(2), 456-463
- Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A (2007): Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 9(6), 461-467
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M (2005): Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6(2), 135-142
- Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M (2008 a): Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8(6), 478-486
- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008 b): The development of allergic inflammation. *Nature* 454(7203), 445-454
- Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ (2001): ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol* 2(7), 597-604
- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, et al. (1993): Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23(10), 2631-2641

- Gordon JR, Galli SJ (1991): Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 174(1), 103-107
- Greenwald RJ, McAdam AJ, Van der Woude D, Satoskar AR, Sharpe AH (2002): Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 168(3), 991-995
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005): The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548
- Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ (1989): Gamma interferon induces different keratinocyte cellular patterns of expression of HLA-DR and DQ and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antigens. *Br J Dermatol* 120(1), 1-8
- Gruaz-Chatellard D, Baumberger C, Saurat JH, Dayer JM (1991): Interleukin 1 receptor antagonist in human epidermis and cultured keratinocytes. *FEBS Lett* 294(1-2), 137-140
- Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A (1998): Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9(4), 875-884
- Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Kögel H, Möller A, Lippert U, Henz BM (1997): Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 45(7), 935-945
- Harvima IT, Nilsson G, Suttle MM, Naukkarinen A (2008): Is there a role for mast cells in psoriasis? *Arch Dermatol Res* 300(9), 461-478
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M (2001): Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10(1), 1-10

- Hoffmann RM, Pape GR, Spengler U, Rieber EP, Eisenburg J, Dohrmann J, Paumgartner G, Riethmüller G (1989): Clonal analysis of liver-derived T cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 76(2), 210-215
- Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E (1996): Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 44(12), 1353-1362
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397(6716), 263-266
- Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dörner T, Kroczeck RA (2004): Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50(10), 3211-3320
- Jaffe R, DeVaughn D, Langhoff E (1989): Fascin and the differential diagnosis of childhood histiocytic lesions. *Pediatr Dev Pathol* 1(3), 216-221
- Jiang WY, Chattedee AD, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Farber EM (2001): Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. *Int J Dermatol* 40, 699-703
- Kashiwakura J, Yokoi H, Saito H, Okayama Y (2004): T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J Immunol* 173(8), 5247-5257
- Kerstens HM, Poddighe PJ, Hanselaar AG (1995): A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 43(4), 347-352
- Khayyamian S, Hutloff A, Büchner K, Gräfe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW (2002): ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9), 6198-6203

- Kienzle G, von Kempis J (2000): CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12(1), 73-82
- Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS (1998): Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur J Immunol* 28(3), 881-890
- Kneilling M, Röcken M (2009): Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights. *Exp Dermatol* 18(5), 488-496
- Kroczek RA, Mages HW, Hutloff A (2004): Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16(3), 321-327
- Krüger-Krasagakes S, Möller A, Kolde G, Lippert U, Weber M, Henz BM (1996): Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells. *J Invest Dermatol* 106(1), 75-79
- Kwon BS, Hurtado JC, Lee ZH, Kwack KB, Seo SK, Choi BK, Koller BH, Wolisi G, Broxmeyer HE, Vinay DS (2002): Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* 168(11), 5483-5490
- Laderach D, Wesa A, Galy A (2003): 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol* 226(1), 37-44
- Lange S, Bender R (2001 a): Median oder Mittelwert? *Dtsch Med Wochenschr* 126, 25-26
- Lange S, Bender R (2001 b): Quantile, empirische Verteilungsfunktion und Box Plot. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 27-28
- Lange S, Bender R (2001 c): Variabilitätsmaße. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 29-30
- Lange S, Bender R (2001 d): Histogramm. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 31-32
- Langstein J, Schwarz H (1999): Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor. *J Leukoc Biol* 65(6), 829-833

- Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H (1998): CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol* 160(5), 2488-2494
- Langstein J, Becke FM, Söllner L, Krause G, Brockhoff G, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H (2000): Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 273(1), 117-122
- Lee UH, Kwack KB, Park JW, Kwon BS (2002): Molecular cloning of agonistic and antagonistic monoclonal antibodies against human 4-1BB. *Eur J Immunogenet* 29(5), 449-452
- Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA (2003): Expression of CD137 (4-1BB) on human follicular dendritic cells. *Scand J Immunol* 57(4), 305-310
- Lippert U, Artuc M, Grützkau A, Möller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D, Norgauer J, Hartmann K, Schweitzer-Stenner R, Zuberbier T, Henz BM, Krüger-Krasagakes S (1998): Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J Immunol* 161(5), 2600-2608
- Lippert U, Babina M, Schwarz H, Zachmann K, Knosalla M, Middel P, Henz BM, Neumann C (2004 a): Role of the CD137 ligand in human mast cells. *Arch Dermatol Res* 295, A59
- Lippert U, Zachmann K, Henz BM, Neumann C (2004 b): Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra- and intracellular CXCR1 and CXCR2. *Exp Dermatol* 13(8), 520-525
- Lippert U, Babina M, Ferrari DM, Schwarz K, Zachmann K, Knosalla M, Middel P, Neumann C (2007): Expression and function of CD137 receptor and ligand in human mast cells. *Exp Dermatol* 16, A103
- Lippert U, Zachmann K, Ferrari DM, Schwarz H, Brunner E, Mahbub-UI Latif AH, Neumann C, Soury A (2008): CD137 ligand reverse signalling has multiple functions in human dendritic cells during an adaptive immune response. *Eur J Immunol* 38(4), 1024-1032

- Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA (2003): Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 197(2), 181-193
- Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, Novitskaya I, Carbonaro H, Cardinale I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Wittkowski KM, Papp K, Garovoy M, Dummer W, Steinman RM, Krueger JG (2005): Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52), 19057-19062
- Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445(7130), 866-873
- Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, Allman D, Addya K, Schlienger K, Riley JL, June CH (2002): Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol* 20(2), 143-148
- May KF Jr, Chen L, Zheng P, Liu Y (2002): Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 62(12), 3459-3465
- McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ (2000): Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165(9), 5035-5040
- Mekori YA, Metcalfe DD (1999): Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol* 104(3 Pt 1), 517-523
- Melero I, Bach N, Hellström KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L (1998): Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol* 28(3), 1116-1121

- Meng H, Marchese MJ, Garlick JA, Jelaska A, Korn JH, Gailit J, Clark RA, Gruber BL (1995): Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 105(6), 789-796
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA (1997): Mast Cells. *Physiol Rev* 77, 1033-1079
- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ (2007): Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 217, 304-328
- Michel J, Pauly S, Langstein J, Krammer PH, Schwarz H (1999): CD137-induced apoptosis is independent of CD95. *Immunology* 98(1), 42-46
- Möller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM (1993): Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* 151(6), 3261-3266
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD (2010): Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 3(2), 111-128
- Mosialos G, Yamashiro S, Baughman RW, Matsudaira P, Vara L, Matsumura F, Kieff E, Birkenbach M (1994): Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kilodalton actin-bundling protein. *J Virol* 68(11), 7320-7328
- Mosialos G, Birkenbach M, Ayehunie S, Matsumura F, Pinkus GS, Kieff E, Langhoff E (1996): Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* 148(2), 593-600
- Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS (1993): Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem* 4(2), 105-111

- Nakae S, Suto H, Iikura M, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ (2006): Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol* 176(4), 2238-2248
- Nakae S, Suto H, Berry GJ, Galli SJ (2007): Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* 109(9), 3640-3648
- Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M (2005): Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202(1), 135-143
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009): Psoriasis. *N Engl J Med* 361(5), 496-509
- Nickoloff BJ, Fivenson DP, Kunkel SL, Strieter RM, Turka LA (1994): Keratinocyte interleukin-10 expression is upregulated in tape-stripped skin, poison ivy dermatitis, and Sezary syndrome, but not in psoriatic plaques. *Clin Immunol Immunopathol* 73(1), 63-68
- Nishimoto H, Lee SW, Hong H, Potter KG, Maeda-Yamamoto M, Kinoshita T, Kawakami Y, Mittler RS, Kwon BS, Ware CF, Croft M, Kawakami T (2005): Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* 106(13), 4241-4248
- Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pittà O, Girolomoni G, Cavani A (2006): CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>(-)</sup> NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* 36(1), 118-128
- Ozkaynak E, Gao W, Shemmeri N, Wang C, Gutierrez-Ramos JC, Amaral J, Qin S, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW (2001): Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2(7), 591-596
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005): A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11), 1133-1141

- Pauly S, Broll K, Wittmann M, Giegerich G, Schwarz H (2002): CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. *J Leukoc Biol* 72(1), 35-42
- Pinkus GS, Pinkus JL, Langhoff E, Matsumura F, Yamashiro S, Mosialos G, Said JW (1997): Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* 150(2), 543-562
- Radzun HJ, Hansmann ML, Heidebrecht HJ, Bödeewadt-Radzun S, Wacker HH, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch MR (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal antibody Ki-M1P. *Lab Invest* 65(3), 306-315
- Reich K, Garbe C, Blaschke V, Maurer C, Middel P, Westphal G, Lippert U, Neumann C (2001): Response of psoriasis to interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. *J Invest Dermatol* 116, 319-329
- Reich K, Mössner R, König IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C (2002): Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* 118, 155-163
- Romagni S (1997): The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18(6), 263-266
- Ross R, Ross XL, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB (1998): The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 160(8), 3776-3782
- Rudd CE, Schneider H (2003): Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3(7), 544-556
- Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K (2007): Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 16(10), 779-798

- Sakiyama H, Kobayashi S, Dianzani U, Ogiuchi H, Kawashima M, Uchiyama T, Yagi J (2008): Possible involvement of T cell co-stimulation in pustulosis palmaris et plantaris via the induction of inducible co-stimulator in chronic focal infections. *J Dermatol Sci* 50(3), 197-207
- Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczek RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T (2004): Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126(3), 829-839
- Sayed BA, Brown MA (2007): Mast cells as modulators of T-cell responses. *Immunol Rev* 217, 53-64
- Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA (2008): The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* 26, 705-739
- Schaefer JS, Montufar-Solis D, Vigneswaran N, Klein JR (2010): ICOS promotes IL-17 synthesis in colonic intraepithelial lymphocytes in IL-10<sup>-/-</sup> mice. *J Leukoc Biol* 87(2), 301-308
- Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B (1994): T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102(2), 145-149
- Schön MP, Boehncke WH (2005): Psoriasis. *N Engl J Med* 352(18), 1899-1912
- Schwarz H (2005): Biological activities of reverse signal transduction through CD137 ligand. *J Leukoc Biol* 77(3), 281-286
- Schwarz H, Tuckwell J, Lotz M (1993): A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene* 134(2), 295-298
- Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, von Kempis J, Lotz M (1995): ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 85(4), 1043-1052

- Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, Lotz M (1996): ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* 87(7), 2839-2845
- Scott BG, Yang H, Tüzün E, Dong C, Flavell RA, Christadoss P (2004): ICOS is essential for the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 153(1-2), 16-25
- Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M (2000): The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci* 113 (17), 3093-3101
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (1997): Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45(3), 327-343
- Shilling RA, Bandukwala HS, Sperling AI (2006): Regulation of T:B cell interactions by the inducible costimulator molecule: does ICOS "induce" disease? *Clin Immunol* 121(1), 13-18
- Shindler KS, Roth KA (1996): Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J Histochem Cytochem* 44(11), 1331-1335
- Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS (1997): 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 186(1), 47-55
- Smith KM, Brewer JM, Webb P, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos C, Garside P (2003): Inducible costimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naive, Th1, and Th2 T cells. *J Immunol* 170(5), 2310-2315

- Soontornniyomkij V, Wang G, Kapadia SB, Achim CL, Wiley CA (1998 a): Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Arch Pathol Lab Med* 122(6), 534-538
- Soontornniyomkij V, Wang G, Pittman CA, Wiley CA, Achim CL (1998 b): Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in activated microglia of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6), 453-460
- Sperling AI, Bluestone JA (2001): ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol* 2(7), 573-574
- Strappe PM, Wang TH, McKenzie CA, Lowrie S, Simmonds P, Bell JE (1997): Enhancement of immunohistochemical detection of HIV-1 p24 antigen in brain by tyramide signal amplification. *J Virol Methods* 67(1), 103-112
- Takahashi C, Mittler RS, Vella AT (1999): Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162(9), 5037-5040
- Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee SK, Mizutani S, Morio T (2009): Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 182(9), 5515-5527
- Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC, Larsen CP (1999): 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163(9), 4859-6488
- Teramoto N, Szekely L, Pokrovskaja K, Hu LF, Yoshino T, Akagi T, Klein G (1998): Simultaneous detection of two independent antigens by double staining with two mouse monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 73(1), 89-97
- Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, Weinstock J, Matis LA, Bluestone JA, Sperling AI (2001): Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol* 167(4), 1996-2003

- Toda Y, Kono K, Abiru H, Kokuryo K, Endo M, Yaegashi H, Fukumoto M (1999): Application of tyramide signal amplification system to immunohistochemistry: a potent method to localize antigens that are not detectable by ordinary method. *Pathol Int* 49(5), 479-483
- Toruniowa B, Jablonska S (1988): Mast cells in the initial stages of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 280(4), 189-193
- Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ (1993): The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 101(5), 701-705
- van Gijlswijk RP, Zijlmans HJ, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997): Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45(3), 375-382
- von Bubnoff D, Andrès E, Hentges F, Bieber T, Michel T, Zimmer J (2010): Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* 125(1), 60-68
- von Wasielewski R, Mengel M, Gignac S, Wilkens L, Werner M, Georgii A (1997): Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 45(11), 1455-1459
- Walls AF, Bennett AR, McBride HM, Glennie MJ, Holgate ST, Church MK (1990): Production and characterization of monoclonal antibodies specific for human mast cell tryptase. *Clin Exp Allergy* 20(5), 581-589
- Wang G, Achim CL, Hamilton RL, Wiley CA, Soontornniyomkij V (1999): Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods* 18(4), 459-464
- Wang S, Chen L (2004): T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* 1(1), 37-42

- Wang S, Kim YJ, Bick C, Kim SH, Kwon BS (1998): The potential roles of 4-1BB costimulation in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(3), 223-231
- Watanabe M, Takagi Y, Kotani M, Hara Y, Inamine A, Hayashi K, Ogawa S, Takeda K, Tanabe K, Abe R (2008): Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses. *J Immunol* 180(8), 5222-5234
- Wessendorf MW, Brelje TC (1992): Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* 98(2), 81-85
- Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, Otsuji M, Shin T, Flies DB, Tamada K, Mittler RS, Tsuchiya H, Pardoll DM, Chen L (2002): Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* 168(9), 4262-4267
- Wilsmann-Theis D, Hagemann T, Jordan J, Bieber T, Novak N (2008): Facing psoriasis and atopic dermatitis: are there more similarities or more differences? *Eur J Dermatol* 18(2), 172-180
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R (2007): Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8(9), 950-957
- Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, Büchner K, Dorner BG, Jonuleit H, Mages HW, Kroczeck RA (2002): ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol* 32(9), 2680-2686
- Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F (1985): Purification and characterization of an F-actin-bundling 55-kilodalton protein from HeLa cells. *J Biol Chem* 260(8), 5087-5097
- Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F (1986): Intracellular localization of the 55-kD actin-bundling protein in cultured cells: spatial relationships with actin, alpha-actinin, tropomyosin, and fimbrin. *J Cell Biol* 103(2), 631-640

- Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Covey LR, Lee JJ, Sinning J, Clark EA, Chess L, Lederman S (1994): CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J Immunol* 152(2), 598-608
- Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Suzuki M, Kodama H, Takemura S, Asano R, Hayashi H, Yamamoto K, Matsuno S, Kudo T (2003): A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 52(2), 97-106
- Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G (1999): T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402(6763), 827-832
- Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Khatcherian A, Bluth MJ, Lowes MA, Krueger JG (2007): Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 204(13), 3183-3194
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, Krueger JG, Lowes MA (2009): Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 129(1), 79-88
- Zaidi AU, Enomoto H, Milbrandt J, Roth KA (2000): Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* 48(10), 1369-1375
- Zheng Y, Jost M, Gaughan JP, Class R, Coyle AJ, Monestier M (2005): ICOS-B7 homologous protein interactions are necessary for mercury-induced autoimmunity. *J Immunol* 174(5), 3117-3121

Zhou Z, Kim S, Hurtado J, Lee ZH, Kim KK, Pollok KE, Kwon BS (1995):  
Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand. *Immunol Lett* 45(1-  
2), 67-73

## VII. Abkürzungsverzeichnis

AEC .....	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AMeX.....	Aceton-Methylbenzoat-Xylol
BMCMC .....	„mouse bone marrow-derived cultured mast cells“, Knochenmark-gewonnene kultivierte Mausmastzellen
CD .....	„cluster of differentiation“, Hauptunterscheidungsmerkmal
CD80 .....	synonym B7-1
CD86 .....	synonym B7-2
Cy3 .....	Indocarbocyanin
Cy5 .....	Indodicarbocyanin
FDC .....	follikuläre dendritische Zelle
GM-CSF .....	„granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor“, Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
ICAM-1 .....	„intercellular adhesion molecule 1“, interzelluläres Adhäsionsmolekül, synonym CD54
ICOS.....	„inducible costimulator“
ICOS-Ligand.....	synonym B7h oder CD275
ICOS-Rezeptor .....	synonym CD278
IFN- $\gamma$ .....	Interferon $\gamma$
IL .....	Interleukin
ILA .....	„induced by lymphocyte activation“,
ILA-Ligand .....	synonym 4-1BBL im Mausmodell
ILA-Rezeptor .....	synonym mit CD137 in der humanen Klassifikation und mit 4-1BB im Mausmodell
LPS.....	Lipopolysaccharid
M-CSF .....	„macrophage colony-stimulating factor“, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MCP.....	„monocyte chemotactic protein“, Monozyten-chemotaktisches Protein
MHC .....	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex

MIG	„monokine induced by interferon $\gamma$ “, Interferon- $\gamma$ -induziertes Monokin
NGF	„nerve growth factor“, Nervenwachstumsfaktor
NK	natürliche Killer-Zellen
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	„platelet-derived growth factor“, Plättchen-abstammender Wachstumsfaktor)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\alpha$	„transforming growth factor $\alpha$ “, transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
TGF- $\beta$	„transforming growth factor $\beta$ “, transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TH	T-Helfer-Zelle
TNB	Tris-NaCl-Blockierungs-Puffer
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TNF- $\beta$	Tumor-Nekrose-Faktor $\beta$
TSA	„Tyramide Signal Amplification“, Tyramid-Signal-Verstärkung
VEGF	„vascular endothelial growth factor“, gefäßendothelialer Wachstumsfaktor

## Danksagung

Zu großem Dank bin ich allen Probanden und Patienten verpflichtet, die an dieser Studie teilgenommen haben. Erst mit ihrem Einsatz und der Bereitschaft, diese Studie zu unterstützen, sind diese Untersuchungen möglich geworden.

Frau Prof. Dr. Ch. Neumann als der vormaligen Direktorin der Abteilung Dermatologie und Venerologie der Universitätsklinik Göttingen gilt mein ganz besonderer Dank für die hervorragende persönliche Unterstützung und die motivierenden und konstruktiven und kritischen Anregungen und Diskussionen. Ihre Hilfsbereitschaft, Kompetenz und didaktischen Fähigkeiten haben mich bei Planung und Durchführung des Projektes begleitet.

Frau Priv.-Doz. Dr. U. Lippert, ehemals Hautklinik der Universität Göttingen, jetzt Städtisches Klinikum Dessau, danke ich für die Überlassung des Themas und die thematische Begleitung der Arbeit, die inhaltliche Diskussion und ihre gedanklichen Anstöße. Sie begleitete in erheblichem Maße die Planung und Durchführung dieser Arbeit und weckte meine Freude an der Forschung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. P. Middel, ehemals Abteilung für Pathologie der Universitätsklinik Göttingen, jetzt Institut für Pathologie Kassel, und seinen Labormitarbeitern danke ich für die Einführung in die methodischen Verfahren der Immunhistochemie. Freundlich und hilfsbereit begleitete er mich durch meine Laborarbeit und stand mir jederzeit bei technischen Schwierigkeiten während der Experimente zur Seite.

Die statistische Auswertung wurde von der Abteilung für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen unterstützt. Hier gilt mein Dank insbesondere Herrn Prof. Dr. E. Brunner und Herrn Dr. F. Konietschke.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Radzun, Leiter der Abteilung für Pathologie der Universitätsklinik Göttingen, danke ich für die Überlassung der Laborräume und insbesondere des Konfokalen Laserscanningmikroskops.

Herrn Prof. Dr. R. Kroczeck vom Robert-Koch-Institut Berlin danke ich für die Bereitstellung der Antikörper F44 und HIL-93.

## **Lebenslauf**

Als Kind der Eheleute Paul Gerhard und Erika Margarethe Knosalla wurde ich am 20. Juni 1978 in Wolfenbüttel geboren.

Nach dem Besuch der Wilhelm-Raabe-Grundschule von 1984 bis 1988 und der Orientierungsstufe Ravensberger Straße von 1988 bis 1990 in Wolfenbüttel besuchte ich ab 1990 das Gymnasium im Schloss in Wolfenbüttel, wo ich 1997 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Von Juli 1997 bis April 1998 leistete ich meinen Grundwehrdienst im Heeresfliegerregiment 16 in Celle.

Im Anschluss begann ich im April 1998 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich am 26. Oktober 2004 mit der Ärztlichen Prüfung erfolgreich abschloss.

Von Februar 2005 bis Oktober 2007 war ich als Assistenzarzt zur Weiterbildung für das Fachgebiet Neurologie in der Neurologisch-Psychiatrischen Klinik des Städtischen Klinikums Braunschweig unter Leitung von Prof. Dr. K. Wessel tätig.

Seit November 2007 bin ich als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie und Klinische Neurolophysiologie des HELIOS Klinikums Wuppertal, Klinikum der Privaten Universität Witten/ Herdecke, unter Leitung von Prof. Dr. S. Isenmann tätig.